

***Turnover* celular e tolerância cardíaca à doxorrubicina no modelo animal.**

Influência do treino físico.

Gabriela Brochado

Porto, 2016

Universidade do Porto

Faculdade de Desporto

***Turnover* celular e tolerância cardíaca à doxorubicina no modelo animal.**

Influência do treino físico.

Dissertação apresentada às provas para
obtenção do grau de Doutor em Atividade Física
e Saúde da Faculdade de Desporto da
Universidade do Porto, nos termos do Decreto-
Lei nº 74/2006 de 24 de março.

Orientador:

Prof. Doutor José Alberto Ramos Duarte

Faculdade de Desporto, Universidade do Porto,
Portugal

Gabriela Brochado

Porto, 2016

Brochado, G. (2017). *Turnover* celular e tolerância cardíaca à doxorubicina no modelo animal. Influência do treino físico. Dissertação apresentada às provas de Doutoramento em Atividade Física e Saúde. Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, Portugal.

PALAVRAS-CHAVE: CARDIOPROTEÇÃO, MIOCÁRDIO, REGENERAÇÃO, EXERCÍCIO REGULAR, CARDIOMIÓCITOS.

Agradecimentos

Este percurso que já vai longo, foi, sem dúvida, um dos mais difíceis e desafiantes que enfrentei na minha vida. Tive a sorte de ter a caminhar ao meu lado muitas pessoas que acreditaram em mim não me deixando desistir, incentivando-me a lutar para chegar até ao fim.

Deste modo a realização da presente tese de doutoramento só foi possível com a colaboração de um vasto número de pessoas, desde professores, familiares, colegas e amigos, que me proporcionaram dentro das suas capacidades e competências todas as informações, recursos e apoio necessários.

É certo que sem a ajuda de todos, não teria sido possível desenvolver o presente trabalho de investigação, sendo, contudo, justo destacar um conjunto de contribuições particularmente relevantes:

Ao meu orientador, o Professor Doutor José Alberto Duarte, tenho que expressar a minha mais sincera gratidão pela sua orientação científica, críticas e sugestões. O seu conhecimento científico e capacidade de trabalho foram um grande incentivo para mim. Mas acima de tudo agradecer a paciência, confiança e amizade que teve para comigo ao longo desta jornada. Espero, um dia, poder ser capaz de retribuir as expectativas e confiança que depositou em mim.

À CESPU, pelo suporte financeiro, concedido ao abrigo das medidas de apoio à qualificação de docentes, bem como pela autonomia que me concederam para a gestão de tempo. Agradeço ainda, a oportunidade e confiança que depositaram em mim, pois permitiu-me crescer pessoal e profissionalmente.

Aos meus amigos, cujos nomes não vou escrever, mas que me apoiaram das mais diversas formas em todas as etapas desta tese.

E, finalmente, aos meus pais, a quem dedico todo este percurso e agradeço profundamente tudo, especialmente aquilo que eu sou. É a vocês que devo tudo.

Muito obrigada.

Índice

Resumo	XV
Abstract	XVII
Introdução	1
Revisão da literatura	9
Material e métodos	29
Resultados	39
Discussão	65
Conclusões	83
Bibliografia.....	87

Índice de figuras

Figura 1. A Esquema representativo do protocolo experimental. B Procedimentos semanais do protocolo experimental.....	32
Figura 2. Valores de mediana (intervalo inter-quartil) do peso dos animais, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com veículo (V) e com doxorubicina (DOX). <i>Baseline</i> : momento de avaliação antes do início do protocolo experimental.....	41
Figura 3. Gráfico de valores de mediana e percentil 25% e 75% do dano tecidual, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V), nas semanas 1, 2, 3 e 4.....	43
Figura 4. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina-eosina, representativos de animais do grupo sedentário, injetados com veículo e sacrificados na primeira (1 ^{as}), segunda (2 ^{as}), terceira (3 ^{as}) e quarta semanas (4 ^{as}) do protocolo experimental. É possível observar que a estrutura dos cardiomiócitos, assim como a organização tecidual, estão preservadas.....	44
Figura 5. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina-eosina, representativos de animais do grupo treinado, injetados com veículo, sacrificados na primeira (1 ^{as}), segunda (2 ^{as}), terceira (3 ^{as}) e quarta semanas (4 ^{as}) do protocolo experimental. Em 1 ^{as} são visíveis cardiomiócitos dispersos com ligeiro edema celular, assim como algumas células infiltrativas. Estas alterações estão presentes em 2 ^{as} , embora mais tenuemente. Em 3 ^{as} e 4 ^{as} a estrutura dos cardiomiócitos assim como a organização tecidual estão normais.....	44
Figura 6. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% da morte celular de cardiomiócitos em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).	46
Figura 7. Fotografias de microscopia de fluorescência de cortes do ventrículo esquerdo, tratados com a técnica de tunel, de animais sedentários (Sed) e treinados (Tre) injetados com veículo e sacrificados na primeira (1 ^{as}), segunda (2 ^{as}), terceira (3 ^{as}) e quarta semana (4 ^{as}) do protocolo experimental. Para	

atestar a qualidade da técnica, são ainda apresentadas duas fotografias, uma de um controlo negativo e outra de um controlo positivo. É de notar o baixo número de células marcadas por campo visual nos animais do grupo sedentário nas diferentes semanas de avaliação. Em contraste, nos animais do grupo treinado, é notório um elevado número de células marcadas por campo na primeira e na segunda semana do protocolo experimental.47

Figura 8. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% do número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).....49

Figura 9. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo tratados por imunohistoquímica para marcação de bromo-desoxi-uridina, de animais sedentários (Sed) e treinados (Tre), injetados com veículo, sacrificados na primeira (1^{as}) e quarta semana (4^{as}) do protocolo experimental. Comparativamente a Sed-1^{as}, é de notar o elevado número de núcleos marcados por campo visual em Tre-1^{as}; na 4^a semana a marcação nuclear é semelhante nos dois grupos.50

Figura 10 a. Gráfico dos valores médios e desvios padrão da percentagem da área de colagénio relativa à área do tecido nos animais dos grupos sedentário (Sed) e treinado (Tre), injetados com veículo (V) nas 4 semanas do protocolo experimental. **b.** Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com *Sirius Red*, representativos de animais dos grupos sedentário (Sed) e treinado (Tre), injetados com veículo (V) e sacrificados na primeira (1^{as}) e quarta semanas (4^{as}) do protocolo experimental. Em todas as fotografias é observável a presença de colagénio, identificado pela coloração vermelha. No grupo treinado, observa-se um ligeiro aumento da densidade de colagénio em 4^{as} comparativamente a 1^{as}. Ao final de uma semana de treino é já notório um ligeiro aumento da densidade de colagénio em Tre-1^{as} (versus Sed-1^{as}) tornando-se mais acentuado em Tre-4^{as}.52

Figura 11. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% da razão glutathiona oxidada (GSSG) / glutathiona total (GSHTotal), nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V), nas semanas 1, 2, 3 e 4. ...53

Figura 12. Gráfico de valores de mediana e percentil de 25% e 75% do dano tecidual total, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX), nas semanas 1, 2, 3 e 4.	55
Figura 13. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina-eosina, representativos de animais dos grupos sedentário (Sed) e treinado (Tre) injetados com doxorubicina, sacrificados na primeira (1 ^{as}) e quarta semanas (4 ^{as}). Em Sed-1 ^{as} e Tre-1 ^{as} , é notória a presença de múltiplos cardiomiócitos edemaciados e vacuolizados, bem como a presença de células infiltrativas com o preenchimento do espaço intersticial com material fibrinoide. Em Sed-4 ^{as} , este padrão mantém-se, no entanto, em Tre-4 ^{as} a vacuolização e o edema dos cardiomiócitos são muito menos frequentes e muito mais ténues.	56
Figura 14. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% do número total de núcleos marcados pelo teste do TUNEL em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).	58
Figura 15. Fotografias de microscopia de fluorescência de cortes do ventrículo esquerdo, tratados com a técnica de tunel, de animais sedentários (Sed) e treinados (Tre), injetados com doxorubicina, sacrificados na primeira (1 ^{as}) e quarta semanas (4 ^{as}) do protocolo experimental. É de notar o elevado número de núcleos marcados por campo visual nos animais do grupo sedentário (Sed-1 ^{as} e Sed-4 ^{as}). Em Tre-1 ^{as} o número de células marcadas não parece ser tão grande como em Sed-1 ^{as} e em Tre-4 ^{as} este número é ainda mais reduzido...	59
Figura 16. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% do número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).	60
Figura 17. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% da razão glutathiona oxidada (GSSG) / glutathiona total (GSHTotal), em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).	63

Índice de tabelas

Tabela 1. Valores de mediana (P25%; P75%) do peso absoluto e relativo dos ventrículos, em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com veículo (V) e com doxorubicina (DOX).....	42
Tabela 2. Valores de mediana (P25%; P75%) de degeneração celular, área de necrose, infiltração celular e organização tecidual em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).	45
Tabela 3. Valores de mediana (P25%; P75%) do número de núcleos marcados por campo visual pelo teste de TUNEL, de cardiomiócitos, de células endoteliais e de fibroblastos, em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).	48
Tabela 4. Valores de mediana (P25%; P75%) do número de núcleos marcados com BrdU, de cardiomiócitos, de células endoteliais e de fibroblastos em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).	51
Tabela 5. Valores de mediana (P25%; P75%) das concentrações de glutathiona reduzida, oxidada e total (GSH, GSSG, GSHTotal), por grama de proteína, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).	53
Tabela 6. Valores de mediana (P25%; P75%) de degeneração celular, área de necrose, infiltração celular e organização celular em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).	57
Tabela 7. Valores de mediana (P25%; P75%) de número de núcleos marcados com BrdU de cardiomiócitos, de células endoteliais e de fibroblastos, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com doxorubicina (DOX).	61
Tabela 8. Valores de mediana (P25%; P75%) das concentrações cardíacas de glutathiona reduzida, oxidada e total (GSH, GSSG, GSHTotal)) em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com doxorubicina (DOX).	62

Resumo

Objetivo: verificar a ocorrência de alterações no *turnover* celular cardíaco com o treino físico, avaliando-se marcadores de dano tecidual, morte e de regeneração celular ao longo de um programa de treino físico em ratos Wistar, associando essas alterações com a tolerância ao exercício agudo e com a tolerância cruzada à doxorrubicina.

Material e Métodos: 80 ratos Wistar, machos, com 5 semanas de idade foram distribuídos aleatoriamente por um grupo sedentário (n=40) e um grupo treinado (n=40) que fizeram corrida 5 dias por semana a uma velocidade de 21m/min, durante 60min. Semanalmente foram sacrificados 10 animais de cada grupo, tendo-lhes sido injetado veículo (n=5) ou doxorrubicina (n=5) 24h antes do seu sacrifício. Na semana do sacrifício foi adicionado na água BrdU aos animais que seriam sacrificados 48h após o último treino. No coração foi quantificada a concentração de glutathione oxidada e reduzida e efetuada análise morfológica por microscopia ótica, usando técnicas de imunohistoquímica e de TUNEL. Para análise estatística utilizou-se os testes não paramétricos com um nível de significância de 5%.

Resultados: nos animais injetados com veículo, os marcadores de dano tecidual, morte e proliferação celular foram mais elevados no grupo treinado nas duas primeiras semanas, tendo diminuído de forma significativa a partir da segunda semana. Observou-se que a síntese e deposição de colagénio foi sempre superior nos animais treinados injetados com veículo ao longo das 4 semanas. Nos animais injetados com doxorrubicina observou-se, na primeira semana, um maior dano tecidual, com morte celular e proliferação de cardiomiócitos nos animais treinados relativamente aos sedentários. No entanto, ao longo do protocolo experimental, estes marcadores diminuíram progressivamente, de forma significativa, nos animais treinados, tendo-se mantido elevados nos animais sedentários. Verificou-se ainda, nos animais treinados injetados com doxorrubicina, que o stress oxidativo foi significativamente inferior nas 3ª e 4ª semanas comparativamente à 1ª semana.

Conclusão: no período temporal estudado, o treino físico promoveu um aumento progressivo da tolerância cardíaca à exigência funcional do exercício agudo e, em simultâneo, um aumento da tolerância cruzada à ação tóxica da doxorrubicina, ambos associados a um aumento do *turnover* celular do coração.

PALAVRAS-CHAVE: CARDIOPROTEÇÃO, MIOCÁRDIO, REGENERAÇÃO, EXERCÍCIO REGULAR, CARDIOMIÓCITOS.

Abstract

Goal: to verify the occurrence of changes in cardiac cell turnover with physical training, evaluating markers of tissue damage, cell death and cell regeneration during a physical training program on Wistar mice, associating these alterations with the cardiac tolerance to acute exercise and with cross-tolerance to doxorubicin. **Material and Methods:** 80 Wistar males, with 5 weeks of age, were randomly distributed for a sedentary group (n=40) and a trained group (n=40) who run 5 days/week at a 21m/min, during 60 minutes. Weekly, ten animals of each group were sacrificed, which received a 24h prior injection of doxorubicina (n=5) or vehicle (n=5). In the week of the sacrifice BrdU was added to the water of the animals to be sacrificed 48h prior to the last run. In the heart, the quantity of oxidised and reduced glutathione as well as the morphological light microscopy analysis, using immunohistochemistry and TUNEL, were assessed. For statistical analysis, non-parametric tests with a 5% of significance were used. **Results:** in the animals injected with vehicle, the markers of tissue damage, cell death and cell proliferation were higher in the trained group during the first two weeks, having decreased significantly from the second week until the end of the protocol. It was observed that collagen synthesis and deposition was always superior in trained animals injected with vehicle over the 4 weeks. In the animals injected with doxorubicin, the tissue damage, cell death and proliferation of cardiomyocytes were higher in the first week in trained animals compared to sedentary ones. However, throughout the experimental protocol, these markers decreased significantly in the trained animals, having remained high in the sedentary animals. It was also verified in trained animals injected with doxorubicin, that oxidative stress was significantly lower at the 3rd and 4th weeks compared to the 1st week. **Conclusion:** in the period studied, physical training promoted a progressive increase of cardiac tolerance to the functional requirement of acute exercise and, simultaneously, increased cross-tolerance to the toxic action of doxorubicin, both associated with an increase in cellular turnover of the heart.

KEY WORDS: CARDIOPROTECTION, MYOCARDIUM, REGENERATION, REGULAR EXERCISE, CARDIOMYOCYTES.

Lista de abreviaturas

ATP – adenosina trifosfato

AVC – acidente vascular cerebral

BrdU – bromo-desoxi-uridina

CSC – *stem cells* cardíacas

CV – cardiovascular

DCI – doença cardíaca isquêmica

DCV – doenças cardiovasculares

DNA – ácido desoxi-ribo-nucleico

DOX – doxorubicina

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPC – células progenitoras endoteliais

EROs – espécies reativas de oxigênio

GSH – glutathiona reduzida

GSHTotal – glutathiona total

GSSG – glutathiona oxidada

HE – hematoxilina-eosina

HSP – proteínas de choque térmico

Ip – intraperitoneal

IR – isquemia-reperfusão

ON[•] – óxido nítrico

PBS – tampão fosfato salino

SED – grupo sedentário

TRE – grupo treinado

TUNEL – *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

As doenças cardiovasculares (DCV) continuam a ser a principal causa de morbidade e mortalidade a nível mundial, representando 31% da mortalidade global (World Health Organization, 2014). As formas mais comuns destas doenças têm uma etiologia complexa, envolvendo múltiplos fatores genéticos e ambientais. Alguns destes fatores, predisponentes ou modeladores, os denominados fatores de risco, como a história familiar, a raça, a idade e o sexo, não são passíveis de ser modificados, mas outros, aqueles dependentes do comportamento, podem sê-lo, nomeadamente o sedentarismo (Kannel, 1983).

A manifestação primária das DCV é o desequilíbrio entre a necessidade de oxigénio nos tecidos e o seu fornecimento, sendo o músculo cardíaco o principal responsável pela manutenção deste equilíbrio através da sua contração. Quando se verifica um desequilíbrio agudo entre a necessidade e o suprimento de oxigénio, ocorre lesão tecidual por isquemia ou isquemia-reperfusão (IR) (Beltrami et al., 1994; Powers et al., 2008).

O paradigma que o coração humano é um órgão pós-mitótico, composto por um número pré-determinado de cardiomiócitos que são estabelecidos no momento do nascimento e conservados durante toda a vida, foi avançado em 1970 (Anversa, Kajstura, et al., 2006). Com base neste conceito, os cardiomiócitos apenas teriam capacidade de se hipertrofiar durante a ontogénese (Chien, 2004; Konstam, 2000; Nadal-Ginard & Mahdavi, 1989) e a sua idade corresponderia à idade do órgão e do organismo (Kajstura, Gurusamy, et al., 2010). Até à década de 70, supunha-se que o coração seria incapaz de regeneração, os cardiomiócitos não poderiam ser substituídos e, em condições de aumento da exigência funcional imposta, ou se adaptavam ou morriam. Assim, a atrofia, a hipertrofia ou a morte dos cardiomiócitos eram as únicas respostas celulares possíveis a um aumento da exigência funcional (Hunter & Chien, 1999), assumindo-se que não existia substituição dos cardiomiócitos, quer pela incapacidade de miócitos diferenciados entrarem em ciclo celular, quer pela ausência de células primitivas residentes (Anversa, Kajstura, et al., 2006).

No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que os seres humanos e outros mamíferos apresentam uma capacidade limitada de regeneração do miocárdio

que é claramente mensurável, mas insuficiente para restaurar integralmente a função cardíaca após lesão extensa, normalmente induzida por estímulos patológicos. Em 2001, Beltrami et al. (2001) demonstraram a presença de miócitos em mitose nos segmentos peri-enfarte e em segmentos distantes, numa fração de 4% e 1%, respetivamente. Também Anversa e Kajstura (1998) demonstraram, pela primeira vez, células multipotentes localizadas no tecido miocárdico, capazes de replicação e formação de clones. Estas evidências apontavam para uma capacidade regenerativa cardíaca a partir de uma população heterogênea de células primitivas, denominadas *stem cells* cardíacas (CSC) (Dawn & Bolli, 2005). Estas células são uma linhagem multipotente, capazes de se diferenciar em cardiomiócitos, células endoteliais ou células musculares lisas (Galetta et al., 2012; Smart et al., 2011). Assim, o paradigma mudou, assumindo-se hoje existir cardiomiócitos de idades diferentes (Anversa, Kajstura, et al., 2006), encontrando-se no miocárdio células novas e velhas, tendo as mais novas, capacidade de replicação. As células mais velhas são habitualmente grandes e estão mais predispostas para a morte celular (Anversa & Nadal-Ginard, 2002; Nadal-Ginard et al., 2003), enquanto as pequenas são mais jovens, podendo reentrar em ciclo celular ou, apenas, variar o seu volume (Anversa & Kajstura, 1998; Anversa & Nadal-Ginard, 2002; Kajstura et al., 1998; Nadal-Ginard et al., 2003).

Quando ocorre um dano cardíaco grave, como por exemplo um enfarte do miocárdio, verifica-se um processo de reparação similar ao que ocorre nos outros tecidos após dano químico ou traumático (Czubryt, 2012; Weber et al., 1996). Deste modo, o tecido lesado é submetido a um processo de restauro, caracterizado por uma cascata de quatro fases que compreendem a hemóstase, a fase inflamatória, a fase proliferativa e a de remodelação, destinadas a reparar a área lesada e, tanto quanto possível, retornar o tecido ao estado estrutural e funcional de pré-lesão (Enoch & Leaper, 2005). Seria desejável que este processo de reparação promovesse a substituição do tecido danificado por tecido novo, estruturalmente idêntico, contudo, quando os danos são extensos o processo cicatricial ocorre com perda de células nobres, com a consequente disfunção. No caso da regeneração cardíaca sabe-se que, apesar de os

cardiomiócitos terem capacidade de autorrenovação ao longo da vida, esta é limitada e lenta (Bergmann et al., 2009; Wilson et al., 2015).

O processo de reparação é necessário ao longo da vida para manter a funcionalidade cardíaca, considera-se que as CSCs podem realmente ter um papel importante na reparação celular do miocárdio, não só durante a renovação celular fisiológica normal, mas também em resposta à lesão celular subclínica (Kocher et al., 2007). Estudos referem que as CSCs são ativadas e diferenciadas numa linhagem de cardiomiócitos em resposta a um aumento da carga de trabalho cardíaco, levando a hiperplasia dos miócitos que, associada à sua hipertrofia, contribui significativamente para o normal crescimento e desenvolvimento do coração até à idade adulta (Nadal-Ginard et al., 2003; Urbanek et al., 2003).

Bergmann et al. (2009) descreveram que a renovação anual de cardiomiócitos ocorre numa taxa de cerca de 1% aos 20 anos e de 0,3% aos 75 anos, sugerindo que aproximadamente 50% dos cardiomiócitos são renovados durante toda a vida. As exigências da vida diária que induzem sobrecarga de pressão intraventricular e aumento do stress metabólico e oxidativo (como o caminhar, correr, nadar, entre outras), assim como o processo natural do envelhecimento, vão matando as células mais velhas e disfuncionais, ou seja, aquelas que não conseguem restabelecer a homeostasia após uma estimulação mais exigente do dia-a-dia (Jin et al., 2000; Kang et al., 2004; Siu et al., 2004).

É sabido que o exercício aumenta a exigência funcional imposta ao organismo, com aumento das necessidades energéticas e aumento da funcionalidade nos vários órgãos e sistemas, nomeadamente no coração, com aumento de débito cardíaco (Powers & Howley, 2009). O exercício agudo isolado, como por exemplo uma corrida de maratona, para além de aumentar o risco de enfarte do miocárdio (Mittleman et al., 1993) e de morte súbita (Albert et al., 2000; Maron et al., 1996; Siscovick et al., 1984), pode induzir danos celulares, inclusive a morte dos cardiomiócitos. Estes danos traduzem-se num aumento plasmático dos biomarcadores de lesão muscular quer cardíaca quer esquelética (Fortescue et al., 2007; Scott et al., 2009).

Vários estudos demonstraram que o exercício prolongado e intenso, em atletas de triatlo e maratona, induz alterações na função da contração da parede do ventrículo esquerdo imediatamente após o exercício (Douglas, O'Toole, & Woolard, 1990; La Gerche et al., 2008) e esta está associado ao aumento dos biomarcadores cardíacos (La Gerche et al., 2008; Neilan et al., 2006). Neilan et al. (2006) referem ainda que esta disfunção e lesão cardíacas se encontram aumentadas em indivíduos destreinados, uma vez que a exigência diária imposta ao sistema cardiovascular, nestes indivíduos, é relativamente baixa. O aumento sérico da troponina de origem cardíaca após o exercício, em níveis elevados, sugere a existência de danos celulares focais do miocárdio (Tehrani & Seto, 2013), apesar da ausência de qualquer tipo de sintomatologia associada. Normalmente, estas alterações nos biomarcadores sistémicos são restabelecidas no período de uma semana após exercício (La Gerche et al., 2008; Neilan et al., 2006).

Sendo o exercício físico agudo um veículo indutor de uma maior estimulação fisiológica que, pela exigência funcional imposta, parece provocar a morte de células cardíacas em sujeitos fisicamente descondicionados, é de especular que sejam sobretudo os cardiomiócitos mais vulneráveis, provavelmente os mais disfuncionais e mais velhos, aqueles a morrer preferencialmente por apoptose pela sua intolerância a estas situações de maior exigência funcional (French et al., 2008; Jin et al., 2000; Kang et al., 2004; Siu et al., 2004).

No entanto, é sabido que o treino físico, quando ajustado, promove uma série de adaptações crónicas no músculo cardíaco, melhorando a sua tolerância não só à exigência dos exercícios agudos, assim como também a outras condições de maior exigência metabólica, de natureza diferente, como sejam os fenómenos de IR (Frasier, Moore, et al., 2011; Kavazis, 2009; Powers et al., 2008). O pré-condicionamento resultante da repetição no tempo do exercício físico induz um fenótipo cardíaco que torna este órgão resistente a condições potencialmente danosas (Ascensao et al., 2007; Benito et al., 2011; Dickson et al., 2008; Ferdinandy et al., 2007; Frasier, Moore, et al., 2011; Frasier, Sloan, et al., 2011; Lennon, Quindry, Hamilton, French, Hughes, et al., 2004; Powers et al., 2002; Powers et al., 2007; Powers et al., 2008). Parece indiscutível que o exercício

físico aeróbio repetido no tempo representa um papel primordial na proteção do coração contra prejuízos causados por IR, expresso tanto pela diminuição da morte tecidual quanto pela melhoria da função cardíaca após exposição a esses estímulos patológicos.

O crescimento cardíaco induzido pelo exercício está associado à hipertrofia celular (Kemi et al., 2002; Waring et al., 2014), ao impedimento da morte celular ou fibrose tecidual (Jin et al., 2000; Kwak et al., 2006; Siu et al., 2004), à ativação das CSCs, à renovação de cardiomiócitos (Bostrom et al., 2010; Ellison et al., 2012; Waring et al., 2014), à angiogenese (Thijssen et al., 2009; Waring et al., 2014; White et al., 1998) e a uma manutenção ou melhoria da função cardíaca (Jin et al., 2000; Waring et al., 2014).

Apesar dos diversos estudos que se têm vindo a realizar no âmbito deste tema da cardioproteção induzida pelo treino físico, os mecanismos responsáveis por estes efeitos cardioprotetores ainda não estão completamente esclarecidos (Borges & Lessa, 2015). Sabe-se que três mecanismos podem explicar este efeito, nomeadamente a melhoria da circulação arterial cardíaca, o aumento da síntese de proteínas de choque térmico e a melhoria na capacidade antioxidante dos cardiomiócitos. No entanto, os mecanismos subjacentes à cardioproteção induzida pelo treino físico podem ser muito mais complexos, envolvendo, para além de mecanismos moleculares inerentes a cada cardiomiócito, também mecanismos de carácter biológico, envolvendo os processos de dano e reparação tecidual. De facto, o exercício agudo, quando praticado por pessoas descondicionadas fisicamente, pela sobrecarga metabólica, mecânica, térmica e oxidativa que induz a nível cardíaco (Nadal-Ginard et al., 2003; Urbanek et al., 2003; Vukusic et al., 2015), pode, hipoteticamente, promover a morte das células mais velhas e disfuncionais e, tendo o coração possibilidade de as substituir pela ativação, mobilização e diferenciação de novas células mais jovens, funcionais e aptas, poderá ser este também um mecanismo de carácter biológico a contribuir para o fenómeno da cardioproteção induzida pelo treino físico, ou seja, pela repetição frequente desse exercício.

Deste modo, o objetivo deste trabalho é o de testar esta hipótese, ou seja, de verificar a ocorrência da substituição celular com o treino físico, avaliando-se marcadores de morte e de regeneração celular ao longo de um programa de treino físico em ratos Wistar. Pretendendo-se ainda saber se estas hipotéticas alterações do *turnover* celular induzidas pelo exercício repetido no tempo se associam a um aumento da tolerância cardíaca à doxorrubicina (DOX).

As doenças cardiovasculares (DCV) continuam a ser uma grande causa de morbidade e mortalidade no mundo (Celermajer et al., 2012; Hoover-Plow & Gong, 2012; Kelly et al., 2012; Towbin & Bowles, 2002), verificando-se que Portugal apresenta a maior taxa de mortalidade por DCV na Europa Ocidental. Apesar de se estar a atingir as metas definidas pelo Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares, em 2013, ainda se verificou que aproximadamente 30% das mortes eram devidas a doenças do aparelho circulatório (DGS, 2016).

As DCV mais frequentes são as de origem aterosclerótica, principalmente o acidente vascular cerebral (AVC), a doença cardíaca isquémica (DCI) e a insuficiência cardíaca (British Heart Foundation, 2017). O desenvolvimento e evolução destas doenças são afetados, para além da idade, pela interação de fatores de risco genéticos e ambientais, sendo estes últimos modulados pelo comportamento. Os fatores genéticos, não modificáveis, incluem o sexo e a raça/etnia. No entanto, tem-se tornado óbvio que os fatores de risco ambientais, tais como o sedentarismo, o tabagismo, a obesidade e as desordens metabólicas associadas à dieta, entre outros, têm uma maior influência no início cada vez mais precoce das doenças degenerativas, como é o caso de algumas DCV. Estes fatores são passíveis de modificação através da alteração dos estilos de vida ou por administração de fármacos (World Heart Federation, 2016), remetendo para uma responsabilização pessoal por parte do indivíduo.

Na sociedade moderna, as oportunidades para o comportamento sedentário, como ver televisão, sentar num carro ou estar sentado ao computador/*tablet*, são ubíquas. Assim, a inatividade física tornou-se uma característica importante do estilo de vida humano, tendo Healy et al. (2011) demonstrado que o adulto médio gasta 50-60% do seu dia utilizando comportamentos sedentários. O comportamento sedentário é o termo direcionado para as atividades que são realizadas na posição deitada ou sentada e que não aumentam o dispêndio energético acima dos níveis de repouso, ou seja, acima de 1,5 equivalentes metabólicos (METs) (Owen et al., 2010). Os resultados duma meta-análise de vários estudos de Cohort mostram, inequivocamente, que o sedentarismo está associado a um aumento do risco da incidência de DCV (Ford & Caspersen,

2012; Kohl et al., 2012), sendo considerado o maior fator de risco modificável subjacente à doença coronária (Bergmann et al., 2009; Shephard & Balady, 1999).

O coração é um órgão vital para o funcionamento do organismo, sendo responsável pela criação de condições hemodinâmicas que permitem a contínua circulação sanguínea e que, dessa forma, permitem a nutrição e oxigenação de todos os tecidos, bem como a remoção dos resíduos metabólicos e dissipação térmica. Em condições normais, a funcionalidade cardíaca está perfeitamente ajustada às exigências metabólicas impostas pelo organismo. Sempre que estas exigências aumentam, como é o caso de uma situação febril ou durante a realização de exercício físico, a funcionalidade cardíaca tem também necessariamente que aumentar. Contudo, nem todos os cardiomiócitos podem estar suficientemente preparados para tolerar as exigências funcionais impostas, quer pela existência de uma patologia subjacente que limite a sua capacidade adaptativa (Hotkar & Balinsky, 2012), quer pela magnitude da exigência funcional imposta (Adams et al., 2008; Thijssen et al., 2009), motivando assim a perda homeostática celular, a disfunção e a morte de cardiomiócitos.

A lesão do miocárdio pode variar desde um pequeno até um grande compromisso, resultando num dano ligeiro ou culminando numa disfunção cardíaca elétrica e mecânica *major* (Powers et al., 2008). O enfarte do miocárdio representa o pior quadro clínico de DCV, com morte e necrose celular de uma área mais ou menos extensa, seguida pela infiltração de células inflamatórias e, caso o doente sobreviva, posterior reparação por desenvolvimento de tecido cicatricial, inevitavelmente associado a vários graus de disfunção contráctil (Beltrami et al., 1994). Esta condição poderá levar a uma perda da estrutura e função ventricular, falência elétrica cardíaca, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva, ou até mesmo à morte (Fraser et al., 2004; Kuethe et al., 2005; Sharpe, 2004; Tiyyagura & Pinney, 2006).

Muitas das anomalias do miocárdio, congénitas ou não, podem estar presentes em indivíduos assintomáticos, caso não se repercutam na funcionalidade cardíaca ou, caso tenham repercussões funcionais, desde que o débito cardíaco

seja mantido, graças à existência de mecanismos de compensação. Estes mecanismos compensatórios podem ser mediados pelo sistema nervoso simpático, através do aumento da contractilidade miocárdica e do aumento da frequência cardíaca, entre outros (Whelan et al., 2010).

Por outro lado, quando o stress fisiológico promove grandes perturbações homeostáticas cardíacas e de forma prolongada, isto é, não passíveis de ser restauradas pelos cardiomiócitos, vão ocorrer alterações bioquímicas, estruturais e funcionais que podem levar à morte das células. A necrose é causada principalmente por trauma físico, químico ou térmico, atingindo normalmente um grande número de células, e tem sido considerada como uma forma de morte celular passiva e descontrolada. Esta é marcada por alterações morfológicas características que são visíveis na microscopia ótica (Feuerstein et al., 1997; Rubin & Farber, 1994), com alterações citoplasmáticas e nucleares, sendo notório o aumento do volume intracelular resultante dos danos que ocorrem na membrana plasmática, dilatação do retículo endoplasmático e edema mitocondrial. Estas células necróticas libertam o seu conteúdo para o espaço extracelular, provocando uma reação inflamatória (Carraro & Franceschi, 1997) com infiltração de fagócitos, os quais, pela sua ação indiscriminada, quer para com as células danificadas, quer para com os cardiomiócitos adjacentes, podem ter, especialmente quando intensa e prolongada, potenciais consequências patológicas (Whelan et al., 2010). Após esta limpeza dos detritos celulares consequente da reação inflamatória, segue-se a formação de tecido de granulação, dando início à cicatrização (Hotkar & Balinsky, 2012; Sun & Weber, 2000). Esta cicatriz resultante, formada por deposição de colagénio (componente não contrátil), resulta necessariamente numa diminuição da funcionalidade máxima ventricular (Fraser et al., 2004).

É hoje aceite que a necrose celular é um evento regulado molecularmente que está normalmente associado a estímulos patológicos externos à célula, sejam eles de carácter mecânico, térmico ou químico, de que são exemplo a hipoxia, a IR, compostos químicos e toxinas bacterianas, entre outros (Vanlangenakker et al., 2008). O organismo humano, face à normal deterioração celular e molecular decorrente do seu uso continuado, apresenta um mecanismo de contínua

substituição celular, onde participa um tipo diferente de morte celular, designado por apoptose, assim como a ativação das células *stem* multipotentes com posterior diferenciação para as células do órgão em causa (Carraro & Franceschi, 1997; Kajstura, Gurusamy, et al., 2010; Primeau et al., 2002). Este tipo distinto de morte celular tem um carácter programado e ocorre em células normais não adaptadas à exigência funcional imposta, podendo ser por isso iniciada como resultado de diversos estímulos de carácter fisiológico (Dirks & Leeuwenburgh, 2002; Pollack et al., 2002; Sastre et al., 2000), como acontece durante o exercício físico agudo (Sandri et al., 1995) ou, pelo contrário, durante a inatividade física ou a imobilização muscular (Allen et al., 1997). No entanto, a apoptose também é observada em situações de patologia ou doença, como acontece na distrofia muscular (Sandri et al., 2001; Sandri et al., 1998), na desnervação (Borisov & Carlson, 2000) e na IR (Adams et al., 1999; Gottlieb et al., 1994; Sharov et al., 1996; Suzuki et al., 1995; Yaoita & Maruyama, 2008). A apoptose é descrita como a morte necessariamente regulada, com características bioquímicas, moleculares e morfológicas específicas, desempenhando um papel considerável durante o desenvolvimento do indivíduo, na homeostase do organismo e, como referido, também em algumas doenças/patologias. É um processo biológico altamente organizado e coordenado, envolvendo gasto energético por parte da célula atingida (Peterson et al., 2008), sendo regulada por um programa de “suicídio” codificado internamente pela regulação coordenada de genes específicos (Ellis et al., 1991; Steller, 1995; Yaoita & Maruyama, 2008; Yuan, 1995, 1996). A apoptose nos organismos multicelulares permite a eliminação de células não-funcionais, “deslocadas”, “anormais” ou danificadas e nocivas, desempenhando assim um papel indispensável no desenvolvimento embrionário, assim como no *turnover* celular e na defesa imunológica do indivíduo adulto (Thompson, 1995).

Até aos finais do século passado, acreditava-se que o coração era um órgão incapaz de regeneração, respondendo fenotipicamente aos estímulos crónicos de aumento da exigência funcional apenas com a hipertrofia dos miócitos existentes (Chien, 2004; Nadal-Ginard & Mahdavi, 1989). Quando a capacidade adaptativa desta hipertrofia se esgotava, a resposta seria a disfunção ventricular

(Anversa, Leri, et al., 2006), por apoptose ou necrose de cardiomiócitos (Leri et al., 2015), uma vez que se assumia não existir substituição destas células, quer devido à incapacidade dos cardiomiócitos para entrar no ciclo celular, quer devido à ausência de células primitivas residentes (Anversa, Kajstura, et al., 2006). Este conceito de que os miócitos não se dividiam surgiu pela dificuldade na identificação de imagens mitóticas em cardiomiócitos, aceitando-se que o coração sobrevivia e exercia a sua função até à morte do organismo com o mesmo ou menor número de células que estavam presentes no nascimento. O principal argumento que suportava este conceito de incapacidade regenerativa do miocárdio era proveniente de dados clínicos e experimentais sugerindo que o coração não seria capaz de se regenerar após enfarte (Leri et al., 2015). De acordo com este ponto de vista, a idade dos miócitos corresponderia à idade do órgão e do organismo (Kajstura, Gurusamy, et al., 2010).

A descoberta mais relevante que veio contrapor este paradigma foi a identificação de células masculinas em corações femininos transplantados em homens (Quaini et al., 2002), sugerindo que as *stem cells* da medula óssea podem migrar para este órgão, dando origem a células cardíacas. Estes dados foram a base do trabalho que conduziu à identificação de CSC residentes no coração adulto (Beltrami et al., 2003). Por outro lado, sabendo-se que a necrose e a apoptose celular são processos naturais de desgaste cuja taxa aumenta com o envelhecimento e com a patologia cardíaca (Januzzi et al., 2012; Omland et al., 2013), começou-se a questionar até que ponto não seria necessária a formação contínua de novos cardiomiócitos para preservar a estrutura e a função do miocárdio.

A primeira demonstração da localização do antígeno nuclear de proliferação celular em cardiomiócitos fetais e em adultos humanos, assim como a identificação de imagens mitóticas de miócitos em cortes histológicos de rotina, foi obtida em meados da década de 1990 (Beltrami et al., 1997; Quaini et al., 1994). Anversa & Kajstura (1998) foram pioneiros ao demonstrarem CSC capazes de replicação e formação de clones, tendo tais células sido identificadas pela presença de marcadores de superfície (células c-kit⁺ e Lin⁻) e, quando injetadas no miocárdio peri-enfarte, originaram novos vasos sanguíneos e

cardiomiócitos jovens. Posteriormente, técnicas mais sofisticadas possibilitaram a identificação de cardiomiócitos em replicação e a visualização da cariocinese e de citocinese de miócitos (Beltrami et al., 2001; Kajstura, Gurusamy, et al., 2010; Kajstura et al., 1998; Kajstura, Urbanek, et al., 2010; Urbanek et al., 2003; Urbanek, Torella, et al., 2005). Dawn & Bolli (2005) e Hou et al. (2013), nos seus estudos, corroboraram estes achados, afirmando que as CSCs têm capacidade de autorrenovação e diferenciação de multi-linhagens.

Neste contexto, têm sido realizados vários estudos para demonstrar que o coração é um órgão com capacidade regenerativa, tendo-se observado que as células da medula óssea apresentam capacidade de se transdiferenciar em CSC (Kajstura et al., 2005; Orlic et al., 2003; Orlic et al., 2001); por outro lado, vários estudos identificaram e caracterizaram CSC em corações de ratos (Beltrami et al., 2003), de ratinhos (Matsuura et al., 2004; Oh et al., 2003) e de cães (Linke et al., 2005). Estas CSC são autorrenováveis, clonáveis e multipotentes, com capacidade de se diferenciarem em cardiomiócitos, bem como noutros tipos de células de tecidos de suporte, tais como o endotélio e o músculo liso das paredes vasculares (Bearzi et al., 2009; Bearzi et al., 2007; Beltrami et al., 2003; Beltrami et al., 2001; Galetta et al., 2012; Laugwitz et al., 2005; Linke et al., 2005; Martin et al., 2004; Smart et al., 2011). Pensa-se ainda que alguns cardiomiócitos existentes consigam voltar a entrar no ciclo celular e se repliquem, gerando assim novos cardiomiócitos (Senyo et al., 2013).

Especula-se que as CSCs residam em nichos do miocárdio, no entanto, dado que o miocárdio não tem a orientação basal-apical típica dos órgãos epiteliais, a localização precisa destes nichos torna-se difícil (Leri et al., 2014), não estando esta ainda completamente esclarecida. Nos estudos de Gonzalez et al. (2008) e de Urbanek et al. (2006) foi utilizada a incorporação de BrdU para observar as CSC e foram descritos nichos aleatórios de CSC BrdU⁺, Lin⁻, C-kit⁺, MDR1⁺ e Sca-1⁺ no ápice e no átrio. No estudo de Meinhardt et al. (2011), realizado em ratinhos, foram identificadas populações de CSC BrdU⁺ com Sca-1⁺, CD31⁻ distribuídos igualmente ao longo do coração, tendo também o epicárdio sido sugerido como um local potencial desses nichos (Balmer & Riley, 2012). Pensa-se, pois, que os nichos das CSC são mais numerosos nos átrios e ápice,

representando áreas anatómicas protegidas, caracterizadas por baixo stress hemodinâmico (Boni et al., 2008; Goichberg et al., 2011; Gonzalez et al., 2008; Hosoda et al., 2009; Sanada et al., 2014; Urbanek et al., 2010; Urbanek, Rota, et al., 2005).

A evidência demonstrada cientificamente nos últimos 15 anos é consistente, suportando o conceito de que a renovação dos cardiomiócitos é relevante na manutenção da homeostasia cardíaca e na contínua reparação do miocárdio (Anversa et al., 2013; Figueiredo et al., 2014; Leri et al., 2011), sendo o coração constituído por uma população heterogênea de miócitos submetidos a constante morte e renovação (Ellison et al., 2013). Esta renovação no indivíduo adulto é, no entanto, ainda muito debatida (Ellison et al., 2013), tendo Bergmann et al. (2009), referido que o *turnover* anual de cardiomiócitos é de 1% ao ano e Senyo et al. (2013) sugerido que este *turnover* varia entre 4 a 10% ao ano.

Assim sendo, tudo indica que, no indivíduo adulto, o miocárdio seja constituído por células de diferentes idades, novas e velhas, umas mais funcionais do que outras e com diferentes capacidades adaptativas a exigências funcionais impostas, e que exista uma pequena fração de cardiomiócitos mais novos que mantêm a capacidade de replicação, sendo as células grandes as mais velhas, não reagindo a estímulos de proliferação e estando mais predispostas para a morte celular (Anversa & Nadal-Ginard, 2002; Nadal-Ginard et al., 2003), enquanto que as células pequenas, as mais jovens, têm a capacidade de reentrar em ciclo celular ou de alterar as suas dimensões (Anversa & Kajstura, 1998; Anversa & Nadal-Ginard, 2002; Nadal-Ginard et al., 2003). Pensa-se que este processo de *turnover* na vida adulta seja suficiente para reparar lesões subclínicas do dia-a-dia. No entanto, aquando da exposição a estímulos patológicos mais agressivos, as áreas celulares do miocárdio evidenciando morte celular são muito extensas e, apesar da regeneração celular ocorrer, é de esperar que o processo de reparação orgânica se faça predominantemente por cicatrização (Figueiredo et al., 2014).

É unanimemente aceite que o exercício físico regular é uma estratégia eficaz para reduzir a morbilidade e mortalidade inerente às DCVs (Sofi et al., 2008). De

facto, o exercício físico praticado regularmente poderá influenciar direta ou indiretamente o risco das DCV pela sua influência sobre alguns fatores de risco modificáveis, como a obesidade, a hipertensão e o sedentarismo, afetando diretamente a remodelação celular e molecular do coração (Ellison et al., 2012). O exercício regular é preventivo para a doença cardíaca isquêmica, sendo também prescrito como medida terapêutica da mesma (Shephard & Balady, 1999). Os programas de reabilitação cardíaca incluem uma intervenção complexa que envolve várias terapias, nomeadamente a farmacológica e a educação para a saúde, no entanto as *guidelines* internacionais identificam de forma consistente o exercício físico regular como o elemento central (Fletcher et al., 2001; Stone et al., 2001).

É sabido que, durante a sua realização, o exercício físico altera a homeostasia orgânica. O aumento das necessidades metabólicas, comparativamente ao repouso dos músculos recrutados, é suprido pelo aumento do aporte sanguíneo local por parte do sistema cardiovascular, envolvendo também aumentos de funcionalidade dos sistemas respiratório, endócrino e nervoso, entre outros. Estas alterações de funcionalidade, as denominadas adaptações agudas do organismo ao exercício, têm por objetivo não só o aumento da capacidade funcional orgânica, mas, sobretudo, também o restabelecimento homeostático e, consequentemente, a sobrevivência do indivíduo durante a realização do exercício (American College of Sports et al., 2009; Blair et al., 1992; Warburton et al., 2006). Assim sendo, durante um exercício físico agudo, e comparativamente ao repouso, há sempre um aumento da exigência funcional imposta, não só aos músculos esqueléticos recrutados, mas também aos diferentes órgãos e sistemas associados com o restabelecimento da homeostasia sistémica, que é diretamente proporcional à intensidade do trabalho motor efetuado (Bostrom et al., 2013; Heinonen et al., 2014).

O exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada e sessões de exercício aeróbico intervalado de alta intensidade podem afetar favoravelmente a função endotelial em adultos jovens saudáveis, sugerindo ser este outro efeito benéfico do exercício regular sobre a progressão da aterosclerose (Siasos et al., 2016). Diversos estudos demonstraram o efeito do exercício físico na redução dos

fatores de risco de DCV, mas também na ação cardioprotetora contra lesões por IR, através de um efeito direto no miocárdio (Dickson et al., 2008; McElroy et al., 1978; Powers et al., 2002; Powers et al., 2008). Assim, é geralmente aceite que o exercício físico regular é uma maneira eficaz para reduzir a morbilidade e mortalidade (Sofi et al., 2008) cardiovascular e, embora pareça evidente que o exercício promove um fenótipo cardioprotetor, os mecanismos exatos para estes benefícios cardioprotetores induzidos pelo exercício são ainda relativamente desconhecidos. Apesar de se ter verificado que, em diferentes tecidos, o exercício ativa as CSCs, ainda não é completamente conhecido o modo como o exercício afeta a distribuição de células percussoras, nem o *turnover* global de células dentro do coração (Vukusic et al., 2015).

No caso de exercícios de alta intensidade, as exigências fisiológicas impostas ao organismo são muito elevadas e, em sujeitos não treinados, esta exigência imposta ao coração pode ter como consequência uma diminuição aguda da funcionalidade máxima cardíaca após o exercício (Douglas, O'Toole, Hiller, et al., 1990; George et al., 2004; Haykowsky et al., 2001; Ketelhut et al., 1994; Niemela et al., 1984; Shave et al., 2004; Vanoverschelde et al., 1991; Whyte et al., 2000). Este fenómeno é normalmente designado por “fadiga cardíaca” induzida pelo exercício (Dawson et al., 2003). Esta diminuição aguda da funcionalidade cardíaca, sistólica e/ou diastólica (Albert et al., 2000; Siscovick et al., 1984) está associada à ocorrência de danos celulares, inclusive a morte dos cardiomiócitos, quer por necrose, quer por apoptose (Downey, 1990). De facto, Douglas et al. (1987), sugerem que o exercício de alta intensidade em indivíduos não treinados, descondicionados, pode ter um impacto prejudicial sobre a função ventricular esquerda. A disfunção cardíaca após esforço físico pode também ser observada após esforços de menor intensidade, mas muito prolongados no tempo, de carácter exaustivo, em indivíduos não preparados fisicamente. No estudo de Middleton et al. (2006), após exercício prolongado, foi descrita uma redução transitória da função do ventrículo esquerdo a qual se associa ao aumento sérico dos biomarcadores cardíacos específicos (La Gerche et al., 2008; Neilan et al., 2006), tais como troponina T (TnT), peptídeo natriurético tipo B (BNP) e N-terminal do peptídeo natriurético pró-cérebro (NT-pro-BNP)

(Scharhag et al., 2005), à diminuição da capacidade de resposta dos recetores cardíacos (Hart et al., 2006) e, ainda, ao aumento do tónus parassimpático (Caulfield, 1993).

Como resposta a um exercício agudo exigente, exaustivo e inabitual, pelos danos induzidos nos diferentes órgãos e sistemas envolvidos, o organismo desencadeia uma resposta inflamatória de carácter sistémico, verificando-se um aumento significativo de leucócitos circulantes assim como uma elevação da concentração sérica de citocinas que regulam a reacção inflamatória, como são as interleucinas 6, 8 e 10 (IL-6, IL-8 e IL-10) (Nieman et al., 2001; Siegel et al., 2001; Suzuki et al., 1999).

Invariavelmente associado a qualquer tipo de exercício físico, há um aumento do consumo de oxigénio que é proporcional à exigência mecânica do mesmo (Borsheim & Bahr, 2003; LaForgia et al., 2006). Este aumento do consumo de oxigénio pelos vários órgãos envolvidos favorece uma maior produção espontânea de espécies reativas de oxigénio (EROs) e, conseqüentemente, agrava, comparativamente ao repouso, o desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidante (Ji & Leichtweis, 1997). Já em 1978, Dillard et al., tinham colocado a hipótese de que durante o exercício físico poderia haver uma formação de EROs em quantidades acima do normal nos tecidos e órgãos de animais e humanos, exagerando os níveis de stress e dano oxidativo teciduais. Pensa-se, por isso, que parte das lesões e inflamações tecidulares induzidos pelo exercício agudo, assim como alguns aspetos relacionados com a fadiga durante a prática de exercícios intensos, podem estar relacionadas com esta formação exagerada de EROs (Atalay et al., 2006).

O aumento da produção de EROs pelas mitocôndrias dos cardiomiócitos, entre outras origens intracelulares, induzido pelo exercício agudo, promove danos oxidativos em estruturas biológicas adjacentes, tais como DNA, proteínas e fosfolípidos (Alessio, 1993; Leeuwenburgh et al., 1999). Estes danos no DNA, quando significativos, podem alterar a expressão das proteínas anti e pró-apoptóticas e, assim, dar início ao processo de apoptose. Em adição, o dano oxidativo dos fosfolípidos das membranas mitocondriais pode desencadear a

libertação mitocondrial de proteínas ativadoras da via das caspases, tais como o Citocromo C, e o fator indutor da apoptose. A liberação do Citocromo C da mitocôndria para o citosol é um evento precoce de apoptose com ativação da Caspase-9, a qual inicia a cascata proteolítica de eventos que resultam em apoptose (Green & Reed, 1998; Sandri et al., 1997).

Para além da ação nefasta das EROs, vários estudos têm demonstrado que os distúrbios do Ca^{2+} intracelular (Pistilli et al., 2006), o fator de necrose tumoral (TNF) e a *Fas ligand* (FasL) induzem a apoptose celular (Gorman et al., 1996; Juo et al., 1998; Li et al., 1998; Nakagawa et al., 2000; Yuan, 1997). Neste sentido, nos últimos anos, os investigadores têm estudado o efeito do exercício agudo, observando que este pode induzir morte celular quer por apoptose, quer por necrose, especialmente quando inabitual e exaustivo (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001; Podhorska-Okolow et al., 1999; Podhorska-Okolow et al., 1998; Primeau et al., 2002; Sandri et al., 1997).

Enquanto que o exercício agudo constitui para o coração e restantes órgãos intervenientes uma situação de maior exigência funcional e, conseqüentemente, de stress fisiológico que pode ou não ser eficazmente superado, estudos epidemiológicos recentes demonstraram que a prática regular de exercício possibilita a aquisição de inúmeros benefícios para a saúde física e mental do indivíduo (Blair et al., 1992; Penedo & Dahn, 2005), nomeadamente a melhoria da performance física, o aumento significativo da qualidade de vida (Bupha-Intr & Wattanapermpool, 2004; Stewart et al., 2006) e a redução do risco de desenvolvimento de diversas doenças crónicas, tais como diabetes *mellitus*, cancro, obesidade, hipertensão e, sobretudo, DCVs (McMullen & Jennings, 2007; Melzer et al., 2004; Warburton et al., 2006). Estes benefícios dependem do volume, da frequência e quantidade de trabalho realizado durante cada exercício agudo, assim como da capacidade adaptativa do sujeito (Rognmo et al., 2004; Schnohr et al., 2015; Tschentscher et al., 2016).

Quando prescrito adequadamente, o exercício físico regular encontra-se associado com a diminuição de eventos cardiovasculares (Hakim et al., 1998; Manson et al., 2002), tendo Siu et al. (2004) demonstrado que o treino físico

atenua a longo prazo os indicadores de apoptose cardíaca e dos músculos esqueléticos, reduzindo a fragmentação do DNA e aumentando os níveis de Bcl-2, HSP70 e Mn-SOD, 48h após a última sessão de treino. O exercício regular melhora ainda a funcionalidade endotelial e a circulação colateral cardíaca em indivíduos com DCVs (Hakim et al., 1998; Hambrecht et al., 1998; Hornig et al., 1996) e em indivíduos saudáveis (Volaklis et al., 2013). Esta melhoria da função endotelial pode estar parcialmente relacionada com uma regeneração do endotélio disfuncional por células percursoras circulantes provenientes da medula óssea (Volaklis et al., 2013). A presença destas células é baixa em condições basais, mas pode aumentar após estimulação endógena ou exógena. A sua libertação é regulada por fatores de crescimento, enzimas “ligantes” e recetores de superfície (Thijssen et al., 2009) e pode ser aumentada por vários estímulos, incluindo drogas e modificação do estilo de vida (Jung et al., 2009).

O exercício físico regular está, também, associado a uma melhoria da pressão arterial, sensibilidade à insulina, peso corporal, e variáveis sanguíneas inflamatórias e hemostáticas (Stewart, 2002), verificando-se uma associação favorável do exercício físico regular com a composição corporal, o metabolismo lipídico e glicolítico, a coagulação do sangue, os marcadores inflamatórios, e o tônus autonómico. Todos esses fatores influenciam a integridade do endotélio vascular, uma explicação plausível para os benefícios cardioprotetores do exercício físico regular (Goto et al., 2003; Hambrecht et al., 2000; Lara Fernandes et al., 2011; Pynn et al., 2004). É sabido que o exercício físico induz adaptações vasculares nomeadamente a produção de hormonas vasoativas, que ocorrem no endotélio, e que alteram o tônus e a resistência dos vasos. A libertação do óxido nítrico (ON[•]), também induzida pelo exercício, causa relaxamento das células musculares lisas e vasodilatação com propriedades antiartrogénicas e antitrombóticas (Jin & Loscalzo, 2010). De facto, o endotélio e a libertação endotelial de ON[•] tem sido postulado como o veículo para a melhoria induzida pelo exercício no perfil de risco cardiovascular (CV) (Green et al., 2008). Também em indivíduos que realizam exercício físico regular, os níveis de células percursoras endoteliais na circulação parecem ser mais elevados, melhorando a disfunção endotelial pré-existente, motivada pelo processo natural

de envelhecimento ou pela presença de fatores de risco cardiovasculares (Volaklis et al., 2013). Os indivíduos treinados apresentam uma contagem 4 vezes superior de células endoteliais progenitoras circulantes quando comparados com sedentários (Bartzeliotou et al., 2007; Butterfield et al., 2008). Já no estudo de Wasserman et al. (1973) se tinha demonstrado que o número de células percursoras era maior em indivíduos (jovens e idosos) treinados do que em sedentários.

Durante um programa de treino físico de alta intensidade, comparativamente à condição sedentária, o coração é submetido a remodelação ventricular fisiológica para se adaptar ao stress adicional, resultando num aumento da massa, da função e da contratilidade cardíaca (Ellison et al., 2012; Jin et al., 2000; Weeks & McMullen, 2011), ocorrendo, pelo menos em parte, pela hipertrofia individual de cardiomiócitos (Kemi et al., 2005; Kemi et al., 2004; Kemi et al., 2002). Vários estudos demonstraram que existe uma dilatação das 4 cavidades e um aumento de espessura da parede em indivíduos sujeitos a treino de *endurance* quando comparados com sedentários (Arbab-Zadeh et al., 2014; Wilson et al., 2015), mas também uma diminuição da frequência cardíaca de repouso (Franzen et al., 2013; Roque et al., 2011). O crescimento cardíaco induzido pelo exercício regular, como protótipo de crescimento fisiológico cardíaco, está associado à estrutura cardíaca, à hipertrofia de miócitos existentes (Kemi et al., 2002; Waring et al., 2014), à ativação das CSCs, à renovação de cardiomiócitos (Bostrom et al., 2010; Ellison et al., 2012; Waring et al., 2014), à angiogenese (Thijssen et al., 2009; Waring et al., 2014; White et al., 1998) resultando numa melhor perfusão e numa manutenção ou melhoria da função cardíaca (Franzen et al., 2013; Green et al., 2012; Jin et al., 2000; Roque et al., 2011; Waring et al., 2014).

Numerosos estudos demonstraram que o exercício físico regular tem efeito protetor das células cardíacas quando expostas a estímulos nefastos de diferente natureza, como sejam as situações de isquemia (Bowles et al., 1992; Lee et al., 1995) ou isquemia-reperfusão (Demirel et al., 1998; Hamilton et al., 2001; Melling et al., 2009; Powers et al., 1998; Strom et al., 2005), a exposição a agentes tóxicos, como por exemplo os agentes quimiotáticos (Ascensao et al.,

2005; Kavazis et al., 2014) e a exposição a situações de hipertermia ou a agentes infecciosos (Freimann et al., 2005; Marini et al., 2007; Powers et al., 2002).

Em estudos animais, verificou-se que o exercício regular de *endurance* protege o coração da lesão induzida por situações de IR (Demirel et al., 2001; Frasier, Moore, et al., 2011; Frasier et al., 2013; Hamilton et al., 2004; Kavazis, 2009; Libonati et al., 2005; Miller et al., 2012; Powers et al., 2008; Quindry et al., 2007), tendo-se demonstrado que apenas 3 a 5 dias de exercício diário de *endurance* são necessários para atingir um nível significativo de cardioproteção contra o enfarte do miocárdio induzido por IR (Demirel et al., 2001; French et al., 2008; Hamilton et al., 2003). Este efeito de cardioproteção depende da intensidade do treino, pensando-se que existe uma intensidade de treino ótima onde este efeito seja atingido (Powers, Smuder, et al., 2014). No entanto, em estudos com roedores, verificou-se que este efeito cardioprotetor é perdido se o treino cessar (Lennon, Quindry, Hamilton, French, Staib, et al., 2004).

Em meados dos anos 70, McElroy et al. (1978) já teriam demonstrado que a prática de exercício físico regular é capaz de conferir cardioproteção, na perspectiva da redução da área de enfarte induzido de 30%, quando compararam ratos ativos e sedentários. Uns anos mais tarde, Brown et al. (2005), corroboraram estes resultados ao concluírem que ratos com treino físico reduziram 25% a área de enfarte em resposta ao mecanismo de IR.

Estas evidências dão suporte à ideia de que o fenótipo cardíaco adquirido após o exercício físico ocorre devido a adaptações biológicas específicas do miocárdio, que são independentes de alterações musculares esqueléticas e/ou do fluxo sanguíneo (Ferdinandy et al., 2007; Lennon, Quindry, Hamilton, French, Hughes, et al., 2004; Powers et al., 2002; Powers et al., 2008). No entanto, os mecanismos fisiológicos específicos envolvidos no pré-condicionamento cardíaco induzido pelo exercício físico ainda são alvo de discussão (Golbidi & Laher, 2011; Powers et al., 2002; Powers et al., 2008; Quindry & Hamilton, 2013).

Parece indiscutível que o exercício físico aeróbico representa um papel primordial na proteção do coração contra os danos causados pela isquemia-reperfusão, tanto pela diminuição da morte celular como pela melhoria da função cardíaca.

De acordo com diversos estudos, os potenciais mecanismos envolvidos na resposta cardioprotetora do exercício regular são o aumento na produção de proteínas de choque térmico (HSP) (Harris & Starnes, 2001; Moran et al., 2005), o envolvimento da via do óxido nítrico (Akita et al., 2007; Babai et al., 2002; Hajnal et al., 2005; Nicholson et al., 2013), o aumento na capacidade antioxidante cardíaca, associada à redução na taxa de produção de EROs nas mitocôndrias do miocárdio (Esposito et al., 2011; Farah et al., 2013; Frasier et al., 2013; French et al., 2008; Hamilton et al., 2003; Yamashita et al., 1999), a melhoria na função dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) presentes no sarcolema e na mitocôndria (Brown et al., 2005; Quindry et al., 2012; Quindry et al., 2010) e a ativação do sistema de opióides (Dickson et al., 2008; Galvao et al., 2011; Michelsen et al., 2012).

O aumento na produção de HSP a nível celular tem um importante papel na manutenção da homeostasia e viabilidade celular. A exposição a situações de stress (por exemplo, hipoxia, hipertermia, isquemia e acidose), pode comprometer a síntese e a função de proteínas vitais, comprometendo assim a longevidade celular (Golbidi & Laher, 2011, 2012). Em resposta a esta exposição, as células sintetizam proteínas específicas, denominadas de “Proteínas de Choque Térmico” ou “Proteínas de Stress”, que auxiliam na manutenção da homeostasia e proteção de proteínas vitais (Powers et al., 2002) através da sua função de *chaperones* moleculares, desempenhando um importante papel na proteção do miocárdio exposto a essas situações (Benjamin & McMillan, 1998; Powers et al., 2001). A classificação das HSP varia de acordo com o seu peso molecular, estando várias famílias, como a HSP10, a HSP60 e a HSP90, relacionadas com os efeitos cardioprotetores referidos. No entanto, a família da HSP70 é a que apresenta maior destaque (Golbidi & Laher, 2011). Mais concretamente, a HSP73, que é sintetizada em maior quantidade quando exposta a situações de stress; e a HSP72, que de forma contrária, só pode ser detetada após um evento de stress como o que ocorre com o exercício físico agudo (Powers et al., 2001), principalmente associada à proteção contra lesões por IR (Esposito et al., 2011; Harris & Starnes, 2001; Moran et al., 2005).

Também o ON⁻ pode desempenhar um importante papel de cardioproteção

induzida pelo exercício regular contra estímulos lesivos de outra natureza (Golbidi & Laher, 2011), funcionando como desencadeador e mediador da fase tardia do pré-condicionamento (após 24 horas) (Hajnal et al., 2005). A sustentar este mecanismo mediado pelo ON⁻, Babai et al. (2002) demonstraram que uma única sessão de exercício físico conferiu cardioproteção contra lesão por IR. Adicionalmente, o estudo desenvolvido por Farah et al. (2013), mostrou que a utilização de bloqueadores de eNOS comprometia a cardioproteção induzida pelo exercício. Por outro lado, também foi mostrado num outro estudo que o exercício permite aumentar a capacidade do coração na redução do nitrito a ON⁻, situação que provavelmente também contribui para essa função cardioprotetora induzida pelo exercício físico (Nicholson et al., 2013).

A capacidade antioxidante cardíaca permite às células em geral proteger-se contra danos causados pelo stress oxidativo. Apesar de estar estudado, ainda não há um consenso acerca do efeito do exercício físico regular na atividade dos agentes antioxidantes do miocárdio (Golbidi & Laher, 2011). Já foi demonstrado que o aumento da taxa de síntese transitória de EROs durante o exercício físico agudo desperta uma adaptação específica capaz de elevar a capacidade antioxidante (Frasier et al., 2013). Existem várias ambiguidades no que concerne à compreensão do papel das enzimas antioxidantes na cardioproteção associada ao exercício. No entanto, como a cardioproteção induzida pelo exercício é vista como um processo multifatorial, onde intervêm diferentes elementos, é possível que não esteja relacionada somente com o aumento da capacidade antioxidante dos cardiomiócitos.

É unanimemente aceite que os canais de sódio atuam como sensores capazes de identificar o equilíbrio iónico e bioenergético celular, para preservar a homeostasia cardíaca em situações de stress metabólico (Noma, 1983). Esta função está baseada na quantidade de ATP no citosol, que em quantidades elevadas promovem o fecho dos canais de K_{ATP} mas, por outro lado, em situações de stress metabólico estimulam a sua abertura (Chicco et al., 2007; Golbidi & Laher, 2011; Noma, 1983). O exercício físico regular apresenta um efeito positivo na cardioproteção uma vez que promove um aumento da

expressão dos canais de K_{ATP} (Brown et al., 2005), bem como na prevenção da morte tecidual (Quindry et al., 2012). A ativação dos canais K_{ATP} induz uma despolarização nas mitocôndrias (Murata et al., 2001), reduzindo a captação e os níveis de Ca^{2+} durante a reperfusão, mantendo a integridade dos organelos celulares, reduzindo a hidrólise (Dos Santos et al., 2002; Vander Heide et al., 1996).

Também o sistema de recetores opióides, como um mecanismo com potenciais propriedades cardioprotetoras, tem vindo a ser estudado devido ao efeito que os opióides têm no sistema cardiovascular. Sabe-se que os peptídeos opióides endógenos aumentam em condições de stress, como acontece em situações de isquemia (Schultz & Gross, 2001). Outros peptídeos opióides, mais especificamente a morfina (agente exógeno), para além de poderem ser utilizados como tratamento da dor associada ao enfarte agudo do miocárdio, também parecem auxiliar na redução da área de enfarte (Schultz et al., 1995). Tendo em conhecimento estes factos, foi especulado que o aumento dos níveis destes opióides em tecidos ventriculares após enfarte pode ocorrer com base num mecanismo compensatório para reduzir a área de enfarte, de forma a neutralizar o elevado nível de catecolaminas que são libertadas durante a isquemia (Schultz & Gross, 2001). O exercício físico, sendo considerado uma situação de stress, acarretaria também um aumento do nível de opióides (Dickson et al., 2008; Thoren et al., 1990). Segundo Dickson et al. (2008) a relação do sistema de opióides com a cardioproteção associada ao exercício demonstrou uma redução de 50% na área de enfarte. Apesar da evidência, Powers, Smuder, et al. (2014), referem que as adaptações celulares responsáveis pelo efeito cardioprotetor do exercícios ainda são alvo de muita discussão.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Oitenta ratos Wistar machos foram obtidos do laboratório Charles River Laboratories España, SA., com aproximadamente 5 semanas de idade, peso médio de 260g, tendo ficado em quarentena por um período de 10 dias. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, 5 ratos por gaiola, numa sala com temperatura de aproximadamente 22°C, humidade relativa do ar de aproximadamente 50-60%, tendo acesso livre a água e ração comercial. Durante o período de quarentena, os animais foram adaptados a um ciclo de luz/escuro invertido 12/12h antes da implementação do protocolo experimental.

Aprovação ética

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a lei Portuguesa e seguiram as especificações e recomendações do US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, Revista 2011), tendo ainda sido aprovado pelo comité de ética da Universidade do Porto, Portugal.

Protocolo experimental

Após o período de quarentena e aclimatização às condições laboratoriais, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: o grupo sedentário (SED; n=40) e o grupo treinado (TRE; n=40). Ao longo do protocolo experimental, que durou 4 semanas, os animais foram pesados semanalmente.

O processo de treino consistiu numa corrida em tapete rolante para animais, com 0% de inclinação, realizada 5 vezes por semana. Durante a primeira semana, os animais TRE foram aumentando diariamente a velocidade e duração da corrida para uma melhor habituação ao programa de treino. Assim, a velocidade inicial de 10m/min do primeiro dia foi progressivamente aumentada para 12 m/min no segundo dia, 15 m/min no terceiro dia, 17 m/min no quarto dia e 21 m/min no quinto dia; da mesma forma, também o tempo de corrida foi sendo diariamente aumentado, passando de 10 min no primeiro dia, para 20 min no segundo dia, 30 min no terceiro dia, 45 min no quarto dia e 60 minutos no quinto dia. Nas

restantes 3 semanas, o treino foi realizado com uma frequência de 1 vez/dia, 5 dias/semana, tendo os animais corrido a uma velocidade de 21m/min, durante 60min, no período da manhã entre as 9 e as 12 horas. Por sua vez, os animais do grupo SED viram, durante todo o período do protocolo experimental, a sua atividade limitada ao espaço da gaiola, tendo sido colocados em contacto com o tapete rolante, mas sem movimento, durante os mesmos períodos de tempo, cinco vezes por semana.

No início de cada semana do protocolo experimental eram seleccionados aleatoriamente 10 ratos de cada grupo (SED e TRE) e, 24 horas após a última sessão de treino semanal, 10 animais foram injetados com veículo (SED+V (n=5) e TRE+V (n=5)) e 10 animais com doxorrubicina (SED+DOX (n=5) e TRE+DOX (n=5)), sendo sacrificados 24h depois. Assim, ao longo do protocolo experimental, 10 animais de cada grupo foram sacrificados no final da primeira, da segunda, da terceira e da quarta semanas (Fig. 1).

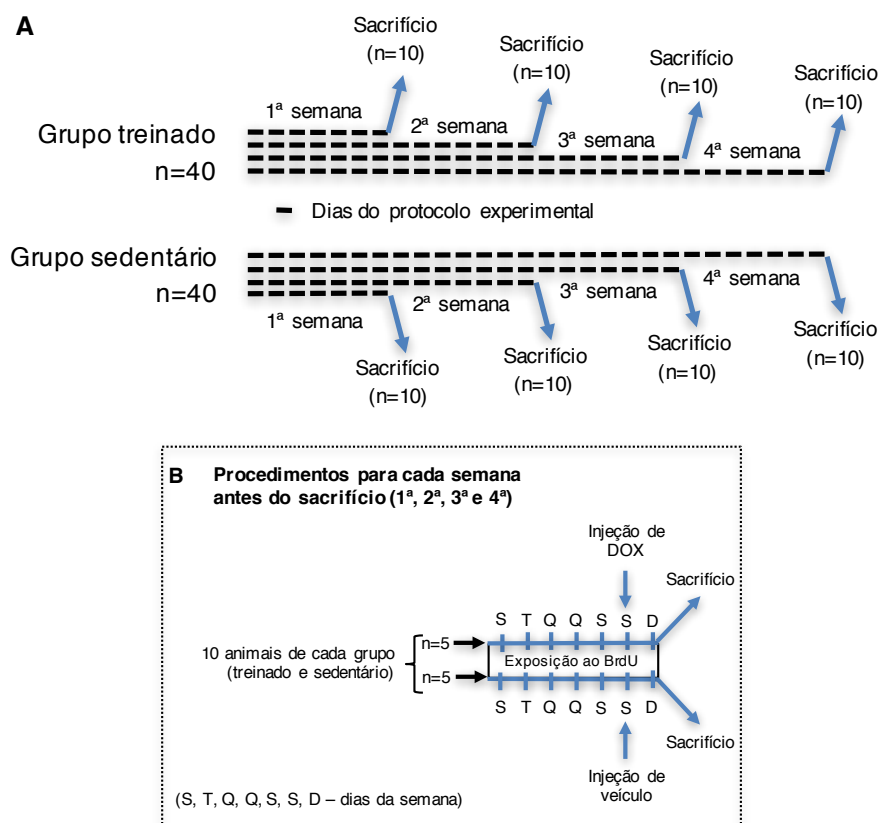


Figura 1. A Esquema representativo do protocolo experimental. **B** Procedimentos semanais do protocolo experimental.

A injeção de DOX foi administrada por via intraperitoneal (ip) numa dose única (20mg/kg de peso corporal em 0,5ml de soro fisiológico), a injeção de veículo foi administrada, através da mesma via, tendo sido utilizado igual volume de solução salina 0,9% (volume de soro fisiológico proporcional ao volume de DOX).

A todos os animais que iam ser sacrificados no final da respetiva semana era colocado diariamente na água bromo-desoxi-uridina (BrdU) na concentração de 1mg/ml (fig. 1B).

Sacrifício dos animais, recolha e processamento dos tecidos

Em cada semana, vinte e quatro horas após a injeção ip, os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (0,09mg/0,01mg por g de peso). Após garantia da ausência de atividade reflexa à estimulação táctil da cauda, das regiões interdigitais e do globo ocular, foi realizada uma laparotomia, o coração foi rapidamente excisado, lavado em solução salina fria (tampão fosfato salino (PBS), 4°C) e secado cuidadosamente. De seguida, retiraram-se os grandes vasos e procedeu-se à separação das aurículas e ventrículos. Depois da separação e pesagem destes (que permitiu o cálculo do peso relativo dos ventrículos “peso ventrículos/peso corporal x 100”), foi cortada a zona do ápice ventricular (2mm), que foi imediatamente fixada em paraformaldeído a 4% para posterior processamento e análise em microscopia de luz. A restante região dos ventrículos foi homogeneizada em 5 ml de TBS-T (pH 7,2) com um *cocktail* inibidor de protease (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO) e centrifugada a 1.500g por 10 minutos (para remoção dos detritos celulares) a 4°C. O homogeneizado foi armazenado a -80°C para posterior quantificação de proteína. Previamente, foi retirada uma fração deste homogeneizado (250µL) e adicionado igual volume de ácido perclórico a 10%, que foi posteriormente centrifugado a 10.000g por 10 minutos a 4°C e congelado a -80°C para futuro doseamento de glutatona oxidada e reduzida.

Preparação dos tecidos para microscopia

Para análise em microscopia de luz, foram utilizados pequenos pedaços do ápice dos ventrículos direito e esquerdo ($\sim 2\text{mm}^3$). Estas peças foram fixadas com paraformaldeído 4%, PBS 0,1 M, pH 7,2 – 7,4, com 2,5% de sacarose e glutaraldeído 0,1%, durante 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas com etanol, diafanizadas com xilol e embebidas em parafina de acordo com os procedimentos histológicos de rotina. Posteriormente, foram realizados, a partir do bloco de parafina, cortes de 5 μm num micrótomo (Leica Microsystems, modelo RM2125), lançados água morna (42-43°C), e montados em lâminas com revestimento de silano (Sigma, S4651-72EA). Estas lâminas foram colocadas durante aproximadamente 48 horas numa estufa com temperatura média de 35°C, com o objetivo de promover maior adesão do tecido. Após desparafinação em xilol e hidratação, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), seguindo os procedimentos de rotina, ou coradas com a técnica de *Sirius Red*, para quantificação do colagénio total. Para esse fim, após exposição ao *Sirius Red* (0,5g/500ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico) durante 2 horas, as lâminas foram lavadas em duas mudanças de água acidificada (5% ácido acético) e posteriormente removido o excesso de água por agitação vigorosa da lâmina. A montagem de todas as lâminas das duas colorações foi efetuada com DPX, seguindo os procedimentos de rotina.

Algumas lâminas não foram coradas desta forma, tendo sido processadas para o teste do TUNEL e de imunodeteção de BrdU.

Quantificação do dano tecidual

Para análise morfológica dos cortes transversais dos ventrículos, as lâminas coradas com HE ou com *Sirius Red* foram fotografadas em microscópio ótico (Carl Zeiss Axio Imager A1) com ampliação de 400x. Para cada grupo foram analisados, de forma cega, mais de 20 cortes histológicos de diferentes peças, a fim de semi quantificar o grau de dano tecidual através do grau da (i) degeneração celular, (ii) infiltração de células inflamatórias intersticiais, (iii) zonas necróticas e a (iv) perda de organização do tecido, de acordo com a

metodologia descrita por (Ascensao et al., 2005; Billingham et al., 1978; Dinis-Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2005; Oliveira et al., 2004; Zhou et al., 2001). Para a degeneração celular, a sua severidade foi classificada de acordo com o número de células que apresentaram alterações (dilatação, vacuolização, núcleos picnóticos e densidade celular) no campo visual da seguinte forma: 0 = sem alteração do normal; 1 = número limitado de células isoladas (até 5% do número total de células); 2 = grupos de células (5-30% do número total de células); e 3 = dano celular difuso (maior que 30% do número total de células). A severidade da reação inflamatória foi classificada da seguinte forma: 0 = sem infiltração celular; 1 = infiltração leve de leucócitos (1 a 3 células por campo visual); 2 = infiltração moderada (4 a 6 leucócitos por campo visual); e 3 = infiltração pesada por neutrófilos. A severidade da necrose foi classificada da seguinte forma: grau 0, sem necrose; grau 1, focos necróticos dispersos; grau 2, áreas necróticas confluentes; grau 3, necrose maciça. A severidade da desorganização tecidual foi classificada de acordo com a percentagem do tecido afetado: 0 = estrutura normal; 1 = menos de um terço do tecido; 2 = superior a um terço e inferior a dois terços; 3 = maior de dois terços do tecido. Com esta metodologia, para cada animal a maior classificação possível de dano tecidual total é de 12 e a menor é de 0.

Quantificação do colagénio

As fotografias de microscopia ótica dos cortes do ventrículo esquerdo e direito corados com *Sirius Red* foram digitalizadas e analisadas com o *software Image Pro Plus 6* para quantificação do colagénio total. Esta quantificação foi apenas realizada nos ratos injetados com veículo uma vez que não se espera que a administração de DOX induza alterações agudas (intervalo de 24 horas) na quantidade de colagénio. Para cada coração processado foram contabilizadas 32 fotografias, totalizando aproximadamente 320 fotografias por grupo. O colagénio presente nos campos analisados foi medido através da seleção das áreas com tonalidades vermelhas tendo esta sido dividida pela área total e o resultado final expresso em percentagem de área observada.

Análises imunohistoquímica e de TUNEL

Foram realizados ensaios para imunolocalização, utilizando anticorpos anti BrdU. Foram ainda realizadas análises histológicas para determinação da morte celular, através do teste do TUNEL.

Após desparafinação em xilol e hidratação em graduações decrescentes de álcool até água destilada, as lâminas com as secções do tecido aderentes foram sujeitas ao processo de *antigen retrieval* na panela de pressão (5 minutos) em tampão citrato. Após lavagem em PBS, foram expostas ao peróxido de hidrogénio a 3% preparado em PBS e metanol durante 5 minutos para bloqueio das peroxidases endógenas. Após desnaturação do DNA, foi utilizado um anticorpo primário monoclonal de coelho específico para o BrdU (Oncogene Research Products, Cambridge, MA), com diluição de 1:50 em PBS / BSA 0,2% / Tween 20 a 0,005%, durante 2 horas a 37° em câmara húmida. Após 3 lavagens de 5 minutos cada em PBS, foi realizada a incubação com anticorpo secundário de cabra anti-coelho, conjugado com peroxidase (A-9044, Sigma) diluído 1:100 em PBS, durante 1 hora. A cor foi desenvolvida com diaminobenzidina / H₂O₂ utilizando um kit comercial (*Sigmafast D4293-50SET, SIGMA-ALDRICH*). Em todos os casos, foram feitos controlos negativos, envolvendo a substituição dos anticorpos primário e secundário por PBS. O número de núcleos marcados foi normalizado para a área de secção do campo microscópico fotografado com recurso ao *software* NIH ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, USA).

Para o teste do TUNEL nas lâminas seleccionadas, recorreu-se ao kit comercial *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (11684795910, Roche Applied Scientific, Indianapolis) seguindo as recomendações do fabricante após ter sido efetuada a desparafinação, hidratação e *antigen retrieval* de acordo com o protocolo atrás descrito. Os controlos positivos foram tratados previamente com DNase I, durante 15 minutos. Posteriormente, todas as amostras foram sujeitas ao bloqueio inespecífico com 3% de BSA e 20% de soro de cabra durante 30 minutos. Para cada coração, foram analisados entre 9 a 10 cortes teciduais, utilizando o microscópio Carl Zeiss Axio Imager A1 com fonte de fluorescência, tendo o número de núcleos positivos sido normalizados para a área do campo

microscópico fotografado com recurso ao *software* NIH ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, USA).

Análises bioquímicas

Para as medições bioquímicas, as peças dos ventrículos direito e esquerdo foram homogeneizadas 1:10 (p / v) em Tris 5 mM (pH 7,5) e EDTA 5 mM (pH 8,0) com um *cocktail* de inibidor de protease (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e centrifugadas a 1500g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante (fração citosólica) foi recolhido. O teor de proteína cardíaca foi avaliado pelo método de Bradford (Sigma). A medição da glutathiona reduzida (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG) foi realizada através de *DTNB-glutathione reductase recycling assay*, como descrito anteriormente (Carvalho, Remiao, et al., 2004; Vandeputte et al., 1994).

Análise estatística

Os dados recolhidos foram analisados pelo IBM SPSS Statistics 24 para Mac, com um nível de significância de 5%. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição das variáveis. Na análise das variáveis que não seguiam a distribuição normal (caracterização morfológica, dano celular, morte celular, proliferação celular e análises bioquímicas), a descrição das variáveis foi efetuada com base no valor de mediana como medida de tendência central, e percentis de 25% e 75%, como medida de dispersão. Para a variável percentagem de colagénio, cuja distribuição se revelou normal, foi utilizado a média e o desvio padrão.

Para efetuar a comparação das variáveis ao longo das 4 semanas do estudo recorreu-se ao teste não paramétrico Kruskal Wallis e, se este evidenciasse diferenças significativas, ao teste de Mann-Whitney para verificar entre que par de semanas essas diferenças eram evidentes. Para a comparação intergrupar, em cada semana do estudo foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Verificou-se o pressuposto da homogeneidade de variâncias para a variável percentagem de colagénio, utilizando o teste de Levene, tendo-se seguido o seu estudo com a análise de variância recorrendo ao teste ANOVA a dois fatores para analisar a interação do tempo e do grupo na percentagem de colagénio no grupo de animais sedentários e treinados, injetados com veículo.

Foi ainda realizado a correlação de Spearman para verificar a associação entre os parâmetros dano tecidual e a morte celular, assim como entre os parâmetros morte celular e proliferação celular.

RESULTADOS

Os dados referentes à caracterização da amostra encontram-se expressos na figura 2 e na tabela 1.

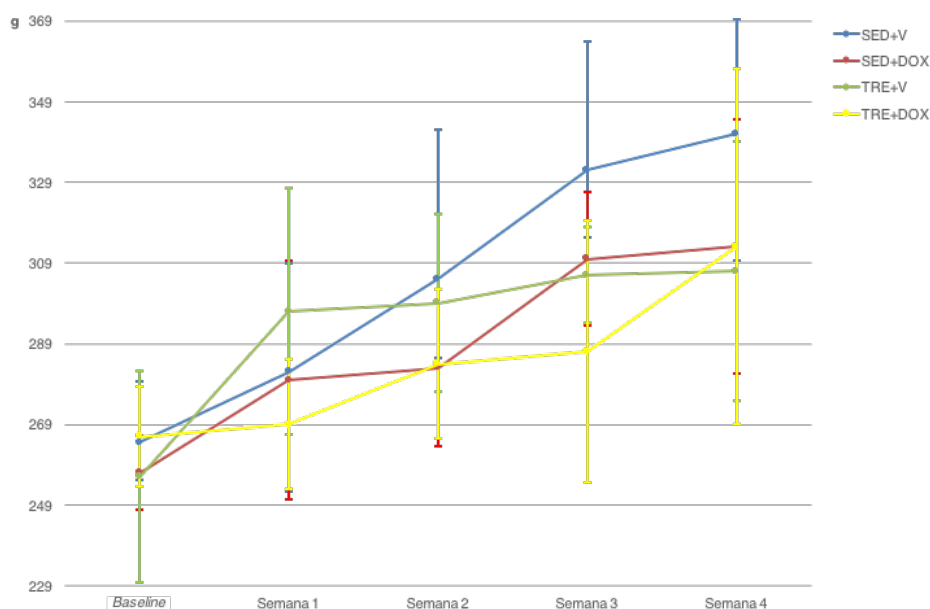


Figura 2. Valores de mediana (intervalo inter-quartil) do peso dos animais, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com veículo (V) e com doxorrubicina (DOX). *Baseline*: momento de avaliação antes do início do protocolo experimental.

Da análise da figura constata-se que, quer os animais do grupo treinado, quer os animais do grupo sedentário, tiveram um aumento de peso ao longo do estudo ($p < 0,001$, SED+V; $p < 0,001$, SED+DOX, $p < 0,001$, TRE+V e $p = 0,001$, TRE+DOX). Este aumento foi mais evidente na 1ª semana para os grupos SED+V, SED+DOX e TRE+V ($p = 0,023$, $p = 0,005$ e $p = 0,020$ vs. *Baseline* respectivamente). Quanto à análise intergrupar, é de salientar que apenas na 3ª semana se encontraram diferenças no peso dos animais, onde os grupos de animais treinados (V e DOX) e sedentário injetado com DOX, revelaram um peso inferior ao dos sedentários injetados com veículo ($p = 0,028$ SED+DOX vs. SED+V; $p = 0,014$ TRE+V vs. SED+V e $p = 0,009$ TRE+DOX vs. SED+V). Nas restantes semanas e na avaliação *baseline* o peso corporal dos animais era similar nos 4 grupos.

Tabela 1. Valores de mediana (P25%; P75%) do peso absoluto e relativo dos ventrículos, em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com veículo (V) e com doxorubicina (DOX).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	p
Peso dos Ventrículos (mg)	SED+V	66,0 (61,0;69,5)	68,0 (67,5;74,0)	70,0 (67,0;76,0)	70,0 (56,0;73,0)	0,252
	SED+DOX	64,0 (50,0;68,0)	60,0 (56,5;69,0)	63,0 (60,5;66,5)	60,0 (58,5;67,5)	0,807
	TRE+V	62,0 (57,0;68,0)	70,0 (67,5;73,5)	66,5 (59,0;73,3)	69,0 (68,0;73,5)	0,101
	TRE+DOX	52,0 (47,0;59,0)	61,0 (56,0;64,0) ^{‡#}	60,0 (55,5;68,0)	66,0 (58,0;71,0)	0,125
	p	0,157	0,023	0,081	0,187	-----
Peso relativo dos ventrículos (%)	SED+V	0,023 (0,021;0,026)	0,023 (0,022;0,024)	0,022 (0,020;0,023)	0,020 (0,020;0,021)	0,054
	SED+DOX	0,023 (0,018;0,024)	0,021 (0,020;0,023)	0,021 (0,020;0,021)	0,019 (0,0,19;0,020)	0,147
	TRE+V	0,022 (0,019;0,025)	0,023 (0,023;0,024) [¶]	0,022 (0,020;0,024)	0,022 (0,021;0,023) ^{‡¶}	0,266
	TRE+DOX	0,020 (0,018;0,022)	0,022 (0,020;0,023) [#]	0,021 (0,020;0,022)	0,022 (0,020;0,022) [¶]	0,576
	p	0,361	0,039	0,501	0,007	-----

[‡] p<0,05 vs. SED+V

[#] p<0,05 vs. TRE+V

[¶] p<0,05 vs. SED+DOX

Da análise da tabela 1 constata-se que a variação do peso absoluto dos ventrículos ao longo das 4 semanas é idêntica nos grupos SED e TRE, mesmo quando relativizadas ao peso corporal (peso relativo dos ventrículos), não se observaram alterações. No entanto, quando comparamos os grupos, verifica-se que na 2ª semana a doxorubicina induziu diminuição do peso dos ventrículos, bem como no seu peso relativo, dos animais TRE (p=0,012 vs. TRE+V; p=0,009 vs. TRE+V). Na 4ª semana, quer no grupo injetado com veículo, quer no grupo injetado com doxorubicina, o treino promoveu um aumento do peso relativo dos ventrículos (p=0,016 vs. SED+V; p=0,016 vs. SED+DOX).

Exigência funcional imposta pelo treino induz tolerância ao exercício

Nas figuras 3, 4 e 5 e na tabela 2, são apresentados os resultados das alterações tecidulares nas quatro semanas do estudo, nos animais dos grupos SED+V e TRE+V.

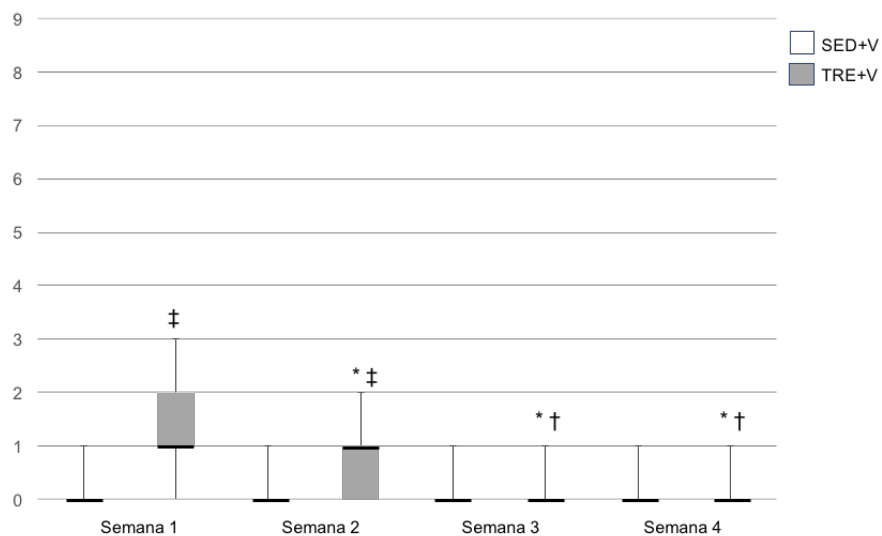


Figura 3. Gráfico de valores de mediana e percentil 25% e 75% do dano tecidual, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V), nas semanas 1, 2, 3 e 4.

* $p < 0,05$ vs, semana 1

† $p < 0,05$ vs, semana 2

‡ $p < 0,001$ vs. SED+V

Verifica-se que, no grupo de animais sedentários, não há alterações estruturais ao longo do tempo uma vez que, mesmo tendo sido detectado algum dano em células pontuais, mais evidente ao nível da degeneração celular, o mesmo não foi significativo ($p > 0,05$) (Fig. 3), tendo as imagens de hematoxilina-eosina (Fig. 4) mostrado que, no global, a estrutura dos cardiomiócitos e a organização celular se mantiveram preservadas.

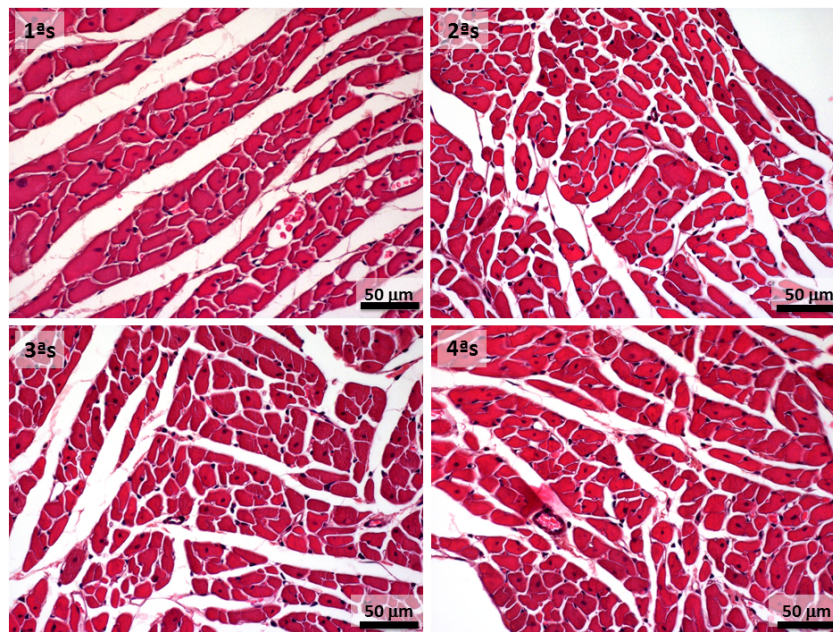


Figura 4. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina-eosina, representativos de animais do grupo sedentário, injetados com veículo e sacrificados na primeira (1ªs), segunda (2ªs), terceira (3ªs) e quarta semanas (4ªs) do protocolo experimental. É possível observar que a estrutura dos cardiomiócitos, assim como a organização tecidual, estão preservadas.

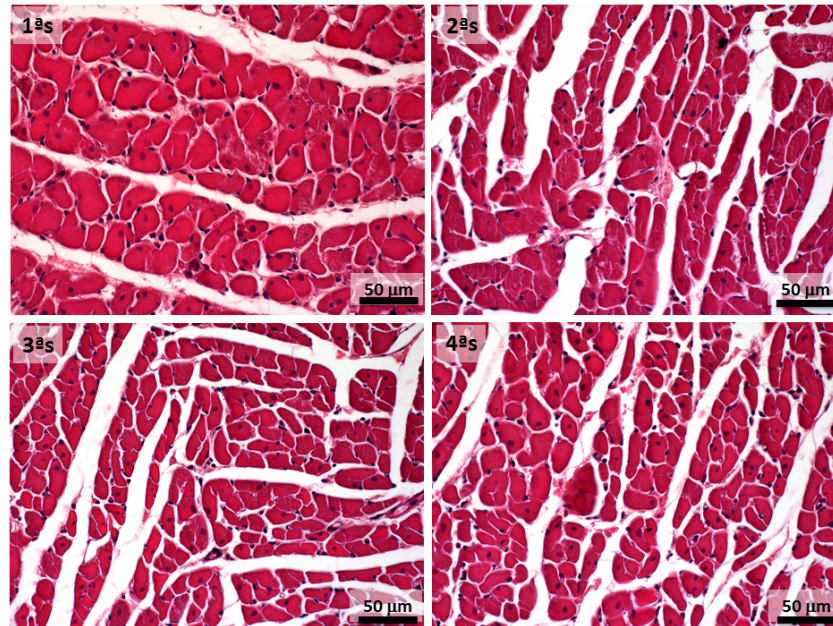


Figura 5. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina-eosina, representativos de animais do grupo treinado, injetados com veículo, sacrificados na primeira (1ªs), segunda (2ªs), terceira (3ªs) e quarta semanas (4ªs) do protocolo experimental. Em 1ªs são visíveis cardiomiócitos dispersos com ligeiro edema celular, assim como algumas células infiltrativas. Estas alterações estão presentes em 2ªs, embora mais tenuemente. Em 3ªs e 4ªs a estrutura dos cardiomiócitos assim como a organização tecidual estão normais.

Contudo, o treino nas suas fases iniciais induziu alterações acentuadas ao nível do músculo cardíaco. Estas manifestam-se nas duas primeiras semanas, tendo-se observado um aumento do dano tecidual nos animais treinados ($p < 0,001$ vs. SED+V) (Fig. 3). Este aumento do dano tecidual é também visível na figura 5, onde se visualizam cardiomiócitos dispersos com edema e algumas células infiltrativas, os quais se mantêm de uma forma menos intensa na semana 2 (Fig. 5: 1^{as} e 2^{as}). Estas alterações foram evidentes pelo aumento da degeneração celular e da área de necrose nas semanas 1 e 2 e da infiltração celular apenas na semana 1 ($p < 0,001$ vs SED+V) (tabela 2), indicador da existência de um quadro ténue de inflamação nesta semana.

Tabela 2. Valores de mediana (P25%; P75%) de degeneração celular, área de necrose, infiltração celular e organização tecidual em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	p
Degeneração celular	SED+V	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,833
	TRE+V	1,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)*	0,0 (0,0;0,0)*†	0,0 (0,0;0,0)*†	<0,001
	p	<0,001	<0,001	0,288	0,163	----
Área de necrose	SED+V	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,386
	TRE+V	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,8)	0,0 (0,0;0,0)*†	0,0 (0,0;0,0)*†	<0,001
	p	<0,001	0,001	1,000	1,000	----
Infiltração celular	SED+V	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,386
	TRE+V	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)*	0,0 (0,0;0,0)*	0,0 (0,0;0,0)*	<0,001
	p	<0,001	0,123	1,000	1,000	----
Organização tecidual	SED+V	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	1,000
	TRE+V	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	1,000
	p	1,000	1,000	1,000	1,000	----

* $p < 0,05$ vs. semana 1

† $p < 0,05$ vs. semana 2

Todavia, o dano tecidual induzido pelo exercício nas 2 primeiras semanas atenuou-se e desapareceu com o tempo de treino. A atenuação do dano celular verificou-se logo na 2^a semana ($p = 0,001$ vs. semana 1), resultado este que se

mostrou evidente à custa da diminuição da infiltração de células inflamatórias ($p=0,015$ vs. semana 1) e na 3ª semana pela diminuição da degeneração celular e área de necrose ($p=0,017$ e $p=0,002$ vs. semana 2, respetivamente). Esta atenuação do dano tecidual prolongou-se com o treino e nas semanas 3 e 4 verificou-se a normalização da estrutura histológica tecidual (Fig. 3; $p<0,001$ vs. semana 1 e 2 e $p>0,05$ vs. SED+V).

Uma vez que muitas das alterações degenerativas celulares podem ser de carácter subletal e reversível, houve a preocupação de se determinar a real taxa de morte celular dos cardiomiócitos, realizada através do teste do TUNEL, tendo sido determinado o número de núcleos marcados por campo visual de 400x (Fig. 6 e 7).

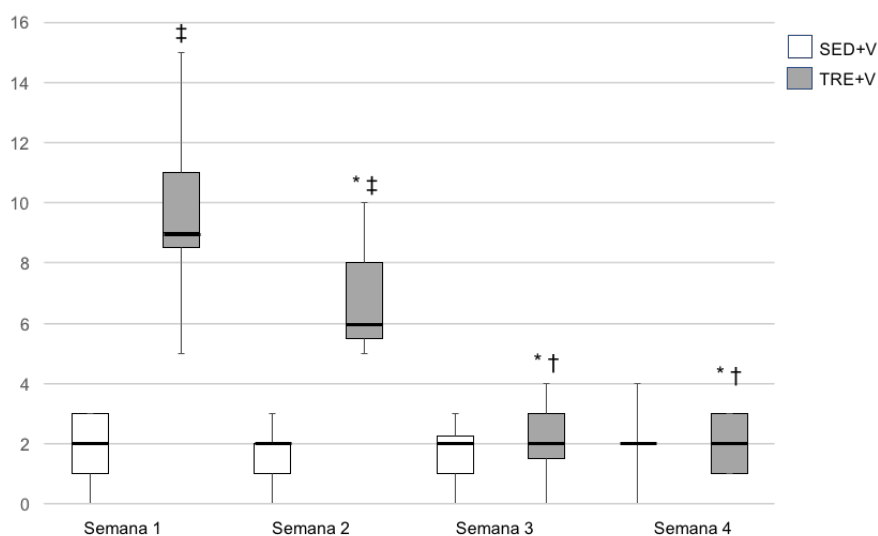


Figura 6. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% da morte celular de cardiomiócitos em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).

* $p<0,05$ vs. semana 1

† $p<0,05$ vs. semana 2

‡ $p<0,05$ vs. SED+V

Os resultados mostram que, mesmo nos animais sedentários, há sempre alguns núcleos marcados, revelando que um pequeno número de células vai morrendo com o tempo, tendo este número de núcleos marcados por campo visual sido

constante em cada semana ao longo das 4 semanas do estudo. Estes resultados podem ser visualizados na figura 7, revelando um baixo número de células marcadas por campo visual, nas 4 semanas no grupo dos animais sedentários. Verifica-se ainda que as células que apresentaram maior número de núcleos marcados são as células endoteliais (tabela 3), apresentando os cardiomiócitos e os fibroblastos um menor número.

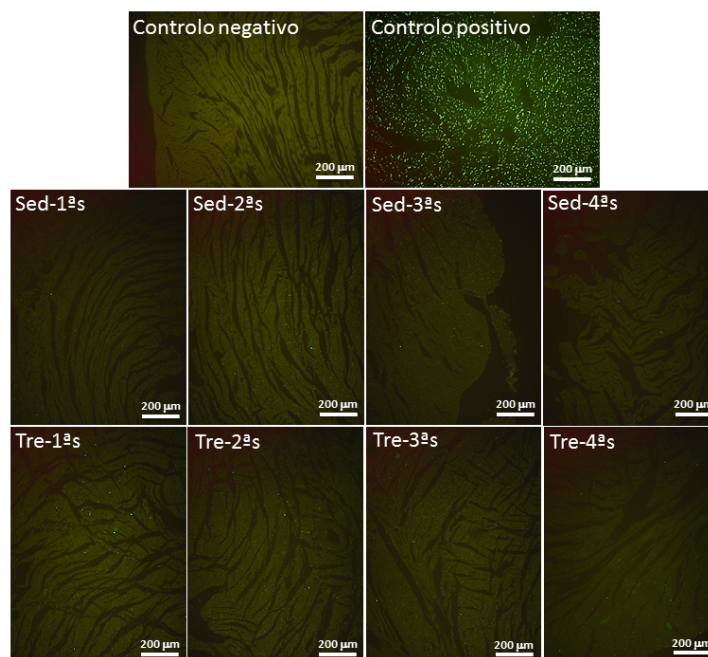


Figura 7. Fotografias de microscopia de fluorescência de cortes do ventrículo esquerdo, tratados com a técnica de tunel, de animais sedentários (Sed) e treinados (Tre) injetados com veículo e sacrificados na primeira (1ªs), segunda (2ªs), terceira (3ªs) e quarta semana (4ªs) do protocolo experimental. Para atestar a qualidade da técnica, são ainda apresentadas duas fotografias, uma de um controlo negativo e outra de um controlo positivo. É de notar o baixo número de células marcadas por campo visual nos animais do grupo sedentário nas diferentes semanas de avaliação. Em contraste, nos animais do grupo treinado, é notório um elevado número de células marcadas por campo na primeira e na segunda semana do protocolo experimental.

Contrariamente, no grupo de animais treinados, observou-se que nas duas primeiras semanas, o número de núcleos marcados foi mais elevado ($p < 0,001$ vs. SED+V), revelando um maior número de células a morrer em cada semana nestas duas semanas (Fig. 6 e 7). Este aumento, quer na 1ª, quer na 2ª semana, foi fundamentalmente devido à maior contribuição dos cardiomiócitos e de células endoteliais, tendo os fibroblastos uma menor contribuição ($p < 0,001$ vs. SED+V) (tabela 3). Porém, na semana 2, com o decorrer do programa de treino,

a morte de cardiomiócitos e de células endoteliais foi significativamente inferior à ocorrida na semana 1 ($p=0,008$ e $p=0,007$ respectivamente), revelando já haver um aumento de tolerância celular a esta exigência funcional aumentada.

Tabela 3. Valores de mediana (P25%; P75%) do número de núcleos marcados por campo visual pelo teste de TUNEL, de cardiomiócitos, de células endoteliais e de fibroblastos, em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	p
Cardiomiócitos	SED+V	0,5 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	0,742
	TRE+V	4,0 (3,0;5,0)	3,0 (2,0;3,0)*	1,0 (0,5;1,0)*†	0,0 (0,0;1,0)*‡	<0,001
	p	<0,001	<0,001	0,008	0,218	-----
Células endoteliais	SED+V	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	0,219
	TRE+V	3,0 (2,5;5,5)	2,0 (1,0;4,0)*	1,0 (0,0;1,0)*†	1,0 (0,5;1,0)*†	<0,001
	p	<0,001	<0,001	0,244	0,239	-----
Fibroblastos	SED+V	0,0 (0,0;1,0)	0,5 (0,5;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	0,582
	TRE+V	2,0 (1,0;3,0)	2,0 (1,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)*†	1,0 (0,0;1,0)*†	<0,001
	p	<0,001	<0,001	0,525	0,483	-----

* $p<0,05$ vs. semana 1

† $p<0,05$ vs. semana 2

‡ $p<0,05$ vs. semana 3

Nas semanas 3 e 4, o número de núcleos marcados foi igual em ambos os grupos ($p>0,05$ vs. SED+V), revelando que existiu uma adaptação à exigência funcional que o treino tinha imposto nas duas primeiras semanas. Esta adaptação ocorreu na 3ª semana para as células endoteliais e fibroblastos ($p=0,244$ e $p=0,525$ vs. SED+V respectivamente), tendo-se verificado que apenas na 4ª semana ocorreu a total adaptação e tolerância dos cardiomiócitos à exigência funcional imposta pelo treino físico ($p=0,218$ vs. SED+V).

Realizou-se a análise da correlação entre o dano tecidual e morte celular nos animais injetados com veículo, tendo-se obtido uma correlação positiva, moderada e significativa ($r=0,527$; $p<0,001$), sugerindo que muitas das células

danificadas identificadas por coloração com HE acabam por morrer, por necrose ou por apoptose.

Para se avaliar a taxa de proliferação celular em cada semana, foi contabilizado o número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual de 400x (Fig. 8 e 9).

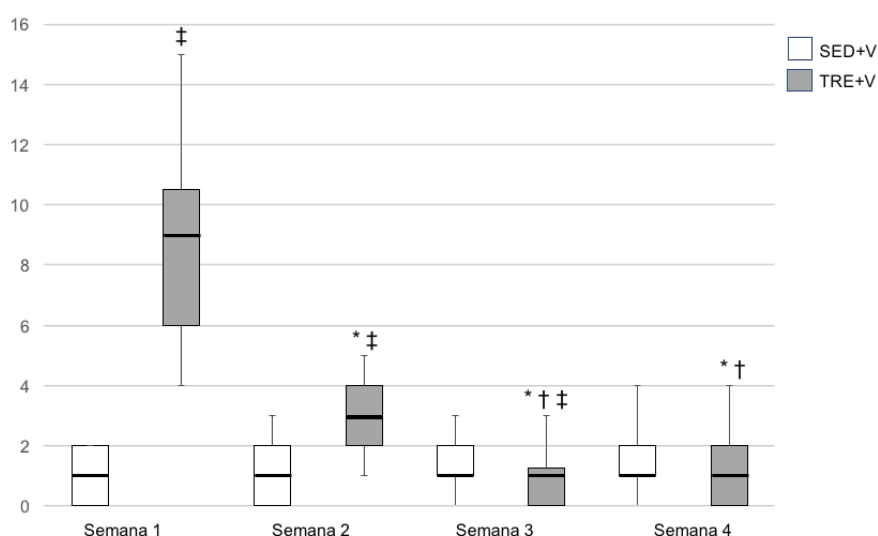


Figura 8. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% do número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).

* $p < 0,05$ vs. semana 1

† $p < 0,05$ vs. semana 2

‡ $p < 0,05$ vs. SED+V

Da análise da figura 8 constata-se que os animais do grupo sedentário apresentam uma taxa de proliferação celular relativamente constante ao longo das 4 semanas do estudo ($p > 0,05$). Esta proliferação foi mais notória ao nível das células endoteliais nas semanas 3 e 4 (tabela 4), não tendo, no entanto, revelado significância estatística ($p = 0,057$).

Pode-se ainda observar, na figura 9, um elevado número de núcleos marcados por campo visual na 1ª semana dos animais treinados que não são visíveis nas mesmas quantidades no grupo SED, enquanto que na 4ª semana se visualiza uma marcação nuclear semelhante nos dois grupos.

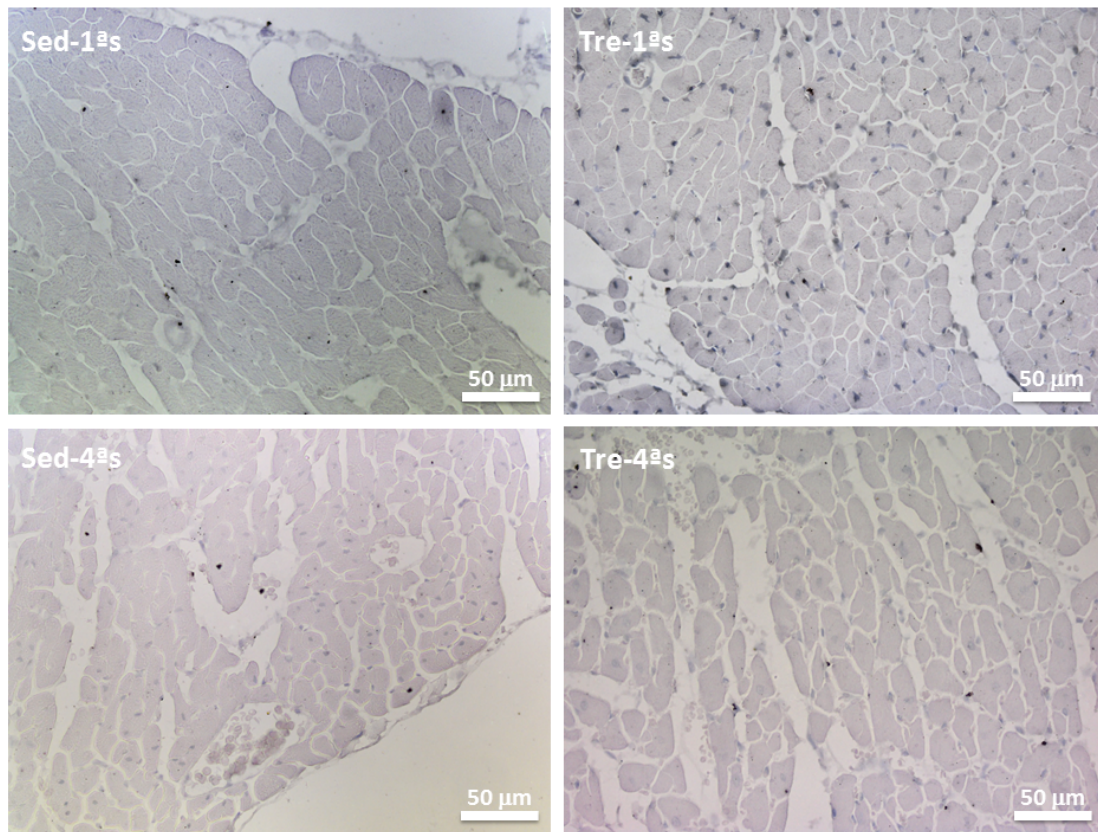


Figura 9. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo tratados por imunohistoquímica para marcação de bromo-desoxi-uridina, de animais sedentários (Sed) e treinados (Tre), injetados com veículo, sacrificados na primeira (1ªs) e quarta semana (4ªs) do protocolo experimental. Comparativamente a Sed-1ªs, é de notar o elevado número de núcleos marcados por campo visual em Tre-1ªs; na 4ª semana a marcação nuclear é semelhante nos dois grupos.

No grupo de animais treinados, verifica-se um aumento de proliferação celular na 1ª e 2ª semanas ($p < 0,001$ vs. SED+V), revelando a resposta do órgão ao aumento da exigência funcional induzida pelo treino. Esta proliferação foi mais notória ao nível das células endoteliais ($p < 0,001$ vs. SED+V), seguida dos cardiomiócitos ($p < 0,001$ vs. SED+V), tendo os fibroblastos aumentado a sua proliferação apenas na 1ª semana ($p < 0,001$ vs. SED+V) (tabela 4).

Tabela 4. Valores de mediana (P25%; P75%) do número de núcleos marcados com BrdU, de cardiomiócitos, de células endoteliais e de fibroblastos em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	p
Cardiomiócitos	SED+V	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,5)	0,0 (0,0;0,3)	0,0 (0,0;1,0)	0,928
	TRE+V	2,0 (1,0;3,0)	1,0 (0,0;1,8)*	0,0 (0,0;1,0)*†	0,0 (0,0;0,0)*†	<0,001
	p	<0,001	<0,001	0,781	0,146	-----
Células endoteliais	SED+V	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;1,0)	0,057
	TRE+V	5,0 (4,0;6,0)	2,0 (1,0;2,0)*	0,0 (0,0;1,0)*†	1,0 (0,0;1,0)*†	<0,001
	p	<0,001	<0,001	0,008	0,601	-----
Fibroblastos	SED+V	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,906
	TRE+V	1,0 (0,5;2,0)	0,0 (0,0;1,0)*	0,0 (0,0;0,3)*	0,0 (0,0;0,3)*	<0,001
	p	<0,001	0,115	0,781	0,390	-----

* p<0,05 vs. semana 1

† p<0,05 vs. semana 2

Estes efeitos verificados nas 2 primeiras semanas foram atenuados com a continuidade do treino, tendo-se observado na 3ª semana que a proliferação celular foi ligeiramente inferior à proliferação encontrada no grupo dos animais sedentários (p=0,047) (Fig. 8). Esta atenuação da proliferação celular na 3ª semana deve-se, essencialmente, à diminuição da proliferação das células endoteliais (p=0,008 vs. SED+V) (tabela 4). Na 4ª semana de treino observa-se que os níveis de proliferação celular são iguais aos encontrados no grupo dos animais sedentários, reveladores da tolerância ao exercício induzida pelo treino físico.

Realizou-se a análise da correlação entre o número de núcleos marcados por campo visual com o teste TUNEL e a proliferação celular analisada através do número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual nos animais injetados com veículo, tendo-se encontrado uma correlação moderada positiva e significativa (r=0,584; p<0,001), indicando que os dois fenómenos ocorrem em paralelo.

Na figura 10 são apresentados os valores de percentagem da área de colagénio relativa à área ocupada pelos cardiomiócitos, com a respetiva ilustração microscópica.

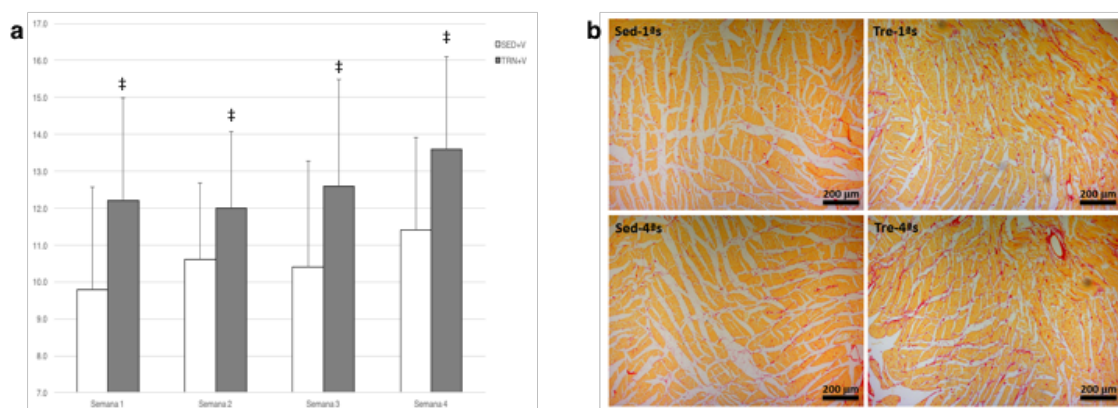


Figura 10 a. Gráfico dos valores médios e desvios padrão da percentagem da área de colagénio relativa à área do tecido nos animais dos grupos sedentário (Sed) e treinado (Tre), injetados com veículo (V) nas 4 semanas do protocolo experimental. **b.** Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com *Sirius Red*, representativos de animais dos grupos sedentário (Sed) e treinado (Tre), injetados com veículo (V) e sacrificados na primeira (1ªs) e quarta semanas (4ªs) do protocolo experimental. Em todas as fotografias é observável a presença de colagénio, identificado pela coloração vermelha. No grupo treinado, observa-se um ligeiro aumento da densidade de colagénio em 4ªs comparativamente a 1ªs. Ao final de uma semana de treino é já notório um ligeiro aumento da densidade de colagénio em Tre-1ªs (versus Sed-1ªs) tornando-se mais acentuado em Tre-4ªs.

[‡] $p < 0,05$ vs. SED+V

Ao observar a figura verifica-se que a síntese e deposição de colagénio ocorre durante as quatro semanas do protocolo, aumentando ligeiramente da primeira para a quarta em ambos os grupos, mas sem significado estatístico. No entanto, observa-se que esta síntese foi superior no grupo de animais treinados ($p=0,011$).

Os efeitos do treino nas concentrações de glutathiona reduzida, oxidada e total e a razão GSSG/GSHTotal, em micromol/g, encontrados nos homogeneizados cardíacos dos animais injetados com veículo, são apresentados na tabela 5 e figura 11.

Tabela 5. Valores de mediana (P25%; P75%) das concentrações de glutatona reduzida, oxidada e total (GSH, GSSG, GSHTotal), por grama de proteína, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	p
GSH micromol/g	SED+V	1,5 (1,4;1,6)	1,5 (1,4;1,7)	1,5 (1,4;1,7)	1,6 (1,4;1,8)	0,835
	TRE+V	1,6 (1,5;1,7)	1,5 (1,7;1,8)	1,5 (1,5;1,7)	1,5 (1,4;1,8)	0,991
	p	0,159	0,751	0,669	0,915	-----
GSSG micromol/g	SED+V	0,2 (0,2;0,3)	0,2 (0,2;0,3)	0,2 (0,2;0,3)	0,2 (0,2;0,3)	0,903
	TRE+V	0,3 (0,2;0,3)	0,2 (0,2;0,3)	0,2 (0,2;0,3)	0,3 (0,2;0,4)	0,506
	p	0,172	0,462	0,599	0,209	-----
GSHTotal micromol/g	SED+V	1,9 (1,7;2,1)	1,9 (1,7;2,2)	2,0 (1,8;2,1)	2,00 (1,8;2,2)	0,917
	TRE+V	2,2 (1,9;2,3)	1,9 (1,8;2,4)	2,0 (1,8;2,2)	2,2 (1,7;2,5)	0,898
	p	0,117	0,602	0,917	0,465	-----

Da análise da tabela, verifica-se não existirem alterações das concentrações de GSH, de GSSG e de GSHTotal ao longo das 4 semanas em nenhum dos grupos ($p > 0,05$), sendo estes níveis similares em ambos ($p > 0,05$ TRE+V vs. SED+V).

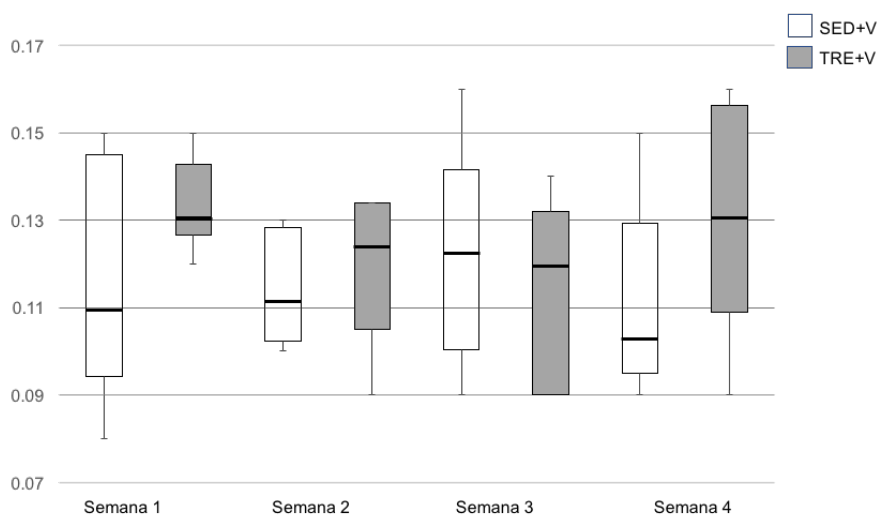


Figura 11. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% da razão glutatona oxidada (GSSG) / glutatona total (GSHTotal), nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com veículo (V), nas semanas 1, 2, 3 e 4.

Da análise da figura 11, constata-se que nem no grupo de animais sedentários nem no grupo de animais treinados houve alterações na relação GSSG/GSHTotal, sugerindo não haver modificações nos níveis de stress oxidativo tecidual.

Evidências da cardioproteção induzida pelo treino físico

Os dados das alterações tecidulares que ocorreram nos animais injetados com doxorubicina, nas 4 semanas do estudo, encontram-se nas figuras 12 e 13 e na tabela 6.

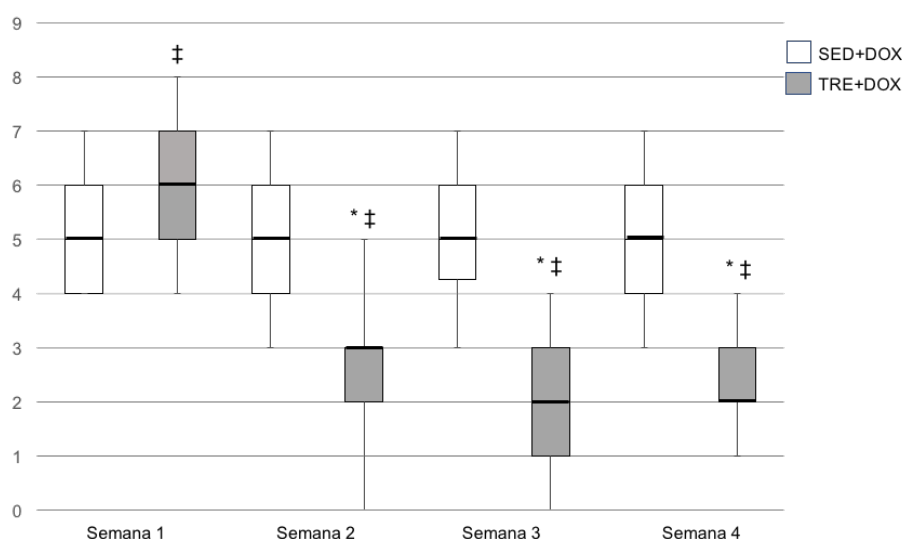


Figura 12. Gráfico de valores de mediana e percentil de 25% e 75% do dano tecidual total, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX), nas semanas 1, 2, 3 e 4.

* $p < 0,05$ vs, semana 1

‡ $p < 0,001$ vs. SED+DOX

Constata-se que o dano total tecidual é, como seria de esperar, 24 horas após a administração da DOX, bastante elevado em ambos os grupos. Os animais sedentários apresentaram uma resposta igual ao longo das 4 semanas (Fig. 12), observando-se a presença de múltiplos cardiomiócitos edemaciados e vacuolizados, bem como a presença de células infiltrativas com o preenchimento do espaço intersticial com material fibrinoide (Fig. 13).

Tal como esperado, e comparativamente aos animais sedentários, nos animais treinados injetados com DOX o dano tecidual na primeira semana foi superior ($p < 0,001$ vs. SED+DOX), como se observa da análise das figuras 12 e 13. Estas

alterações foram mais evidentes na componente degeneração celular e áreas de necrose ($p=0,003$ vs. SED+DOX e $p=0,002$ Vs. SED+DOX) (tabela 6).

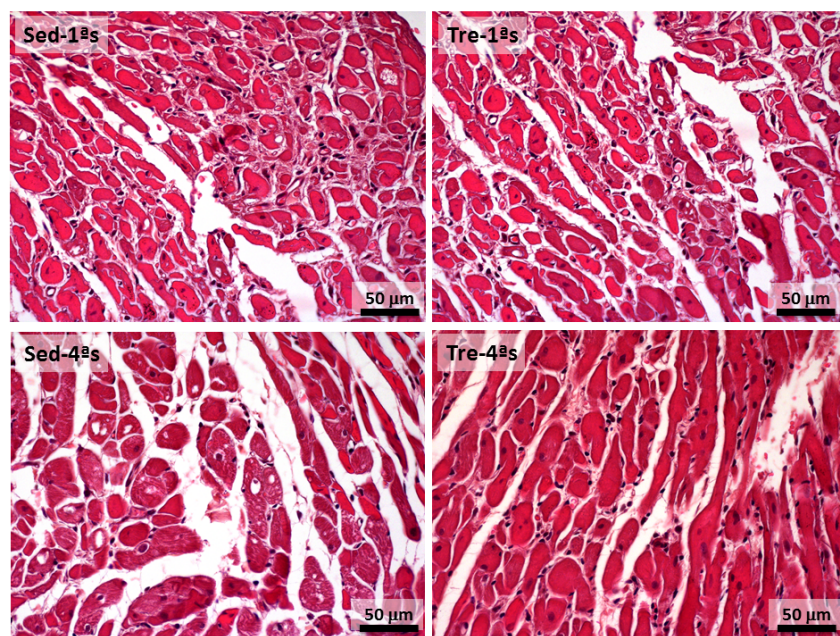


Figura 13. Fotografias de microscopia ótica de cortes do ventrículo esquerdo, corados com hematoxilina-eosina, representativos de animais dos grupos sedentário (Sed) e treinado (Tre) injetados com doxorrubicina, sacrificados na primeira (1ªs) e quarta semanas (4ªs). Em Sed-1ªs e Tre-1ªs, é notória a presença de múltiplos cardiomiócitos edemaciados e vacuolizados, bem como a presença de células infiltrativas com o preenchimento do espaço intersticial com material fibrinoide. Em Sed-4ªs, este padrão mantém-se, no entanto, em Tre-4ªs a vacuolização e o edema dos cardiomiócitos são muito menos frequentes e muito mais ténues.

As principais evidências de cardioproteção induzida pelo treino ocorrem nos primeiros momentos de avaliação, tendo-se verificado logo na segunda semana que as alterações tecidulares induzidas pela DOX, encontradas nos animais treinados, foram significativamente inferiores às encontradas no mesmo grupo na semana 1 ($p<0,001$) e também inferiores às do grupo de animais sedentários na segunda semana ($p<0,001$). Este efeito cardioprotetor prolongou-se durante as restantes semanas, tendo-se observado que nas 3ª e 4ª semana as alterações tecidulares induzidas pela doxorrubicina no grupo de animais treinados foram sempre significativamente inferiores às do grupo sedentário ($p<0,001$) para o mesmo momento de avaliação.

Tabela 6. Valores de mediana (P25%; P75%) de degeneração celular, área de necrose, infiltração celular e organização celular em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	p
Degeneração celular	SED+DOX	2,0 (1,8;3,0)	2,0 (2,0;3,0)	2,0 (2,0;3,0)	2,0 (2,0;3,0)	0,789
	TRE+DOX	3,0 (2,0;3,0)	1,5 (1,0;2,0)*	1,0 (1,0;1,0)*†	1,0 (1,0;1,0)*†	<0,001
	p	0,003	0,002	<0,001	<0,001	----
Área de necrose	SED+DOX	1,0 (0,0;2,0)	1,5 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;2,0)	0,136
	TRE+DOX	2,0 (1,0;2,0)	1,0 (0,0;1,0)*	1,0 (0,0;1,0)*	1,0 (0,0;1,0)*	<0,001
	p	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	----
Infiltração celular	SED+DOX	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;2,0)	0,313
	TRE+DOX	1,5 (1,0;2,0)	0,0 (0,0;1,0)*	1,0 (0,0;1,0)*	0,0 (0,0;1,0)*	<0,001
	p	0,391	<0,001	<0,001	<0,001	----
Organização tecidual	SED+DOX	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,5)	0,160
	TRE+DOX	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)*	0,0 (0,0;0,0)*	0,0 (0,0;0,0)*	<0,001
	p	0,866	<0,001	0,006	0,001	----

* p<0,05 vs. semana 1

† p<0,05 vs. semana 2

Na semana 2 dos animais TRE foi notória uma diminuição da presença de células infiltrativas ($p<0,001$ vs. semana 1), tendo-se também encontrado menor edema e vacuolização celular, indicando a presença do efeito cardioprotetor do treino. De referir ainda que, na 3ª e 4ª semanas, no grupo de animais treinados, se continuou a observar alterações, apesar das células que apresentaram degeneração celular terem sido em menor número do que na 2ª semana ($p=0,001$ e $p=0,025$ respetivamente).

A morte dos cardiomiócitos foi avaliada através do teste do TUNEL, tendo sido contabilizado o número de núcleos marcados por campo visual de 400x (Fig. 14 e 15).

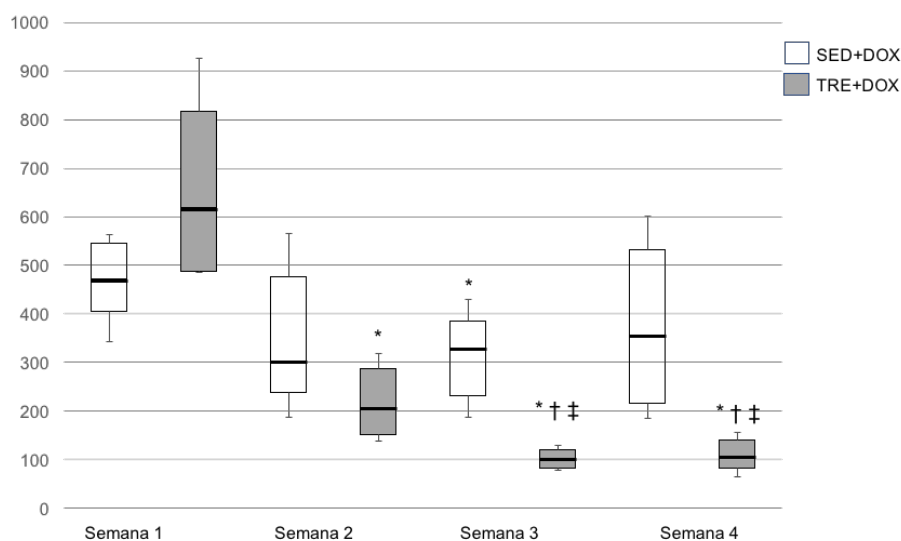


Figura 14. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% do número total de núcleos marcados pelo teste do TUNEL em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).

* $p < 0,05$ vs. semana 1

† $p < 0,05$ vs. semana 2

‡ $p < 0,05$ vs. SED+DOX

A figura 14 ilustra, nos animais sedentários após a administração da DOX, que a morte celular é muito elevada em todas semanas ($p < 0,001$ vs. SED+V) (Fig. 6 e 7), verificando-se que não existiram alterações ao longo do protocolo nos animais do grupo SED+DOX. No grupo de animais treinados também a morte celular, nas 4 semanas, apresenta valores altos (Fig. 14 e 15), onde se observa elevado número de núcleos marcados por campo visual nos animais, que diferem substancialmente do número de núcleos marcados nos animais injetados com veículo (Fig. 6 e 7) ($p < 0,001$ vs. TRE+V). O número de núcleos marcados na 1ª e 2ª semanas não diferiu significativamente entre os grupos SED+DOX e TRE+DOX, no entanto, na 3ª e 4ª semanas este número foi significativamente inferior nos animais do grupo TRE+DOX ($p = 0,009$ vs. SED+DOX), como se observa nas figuras 14 e 15.

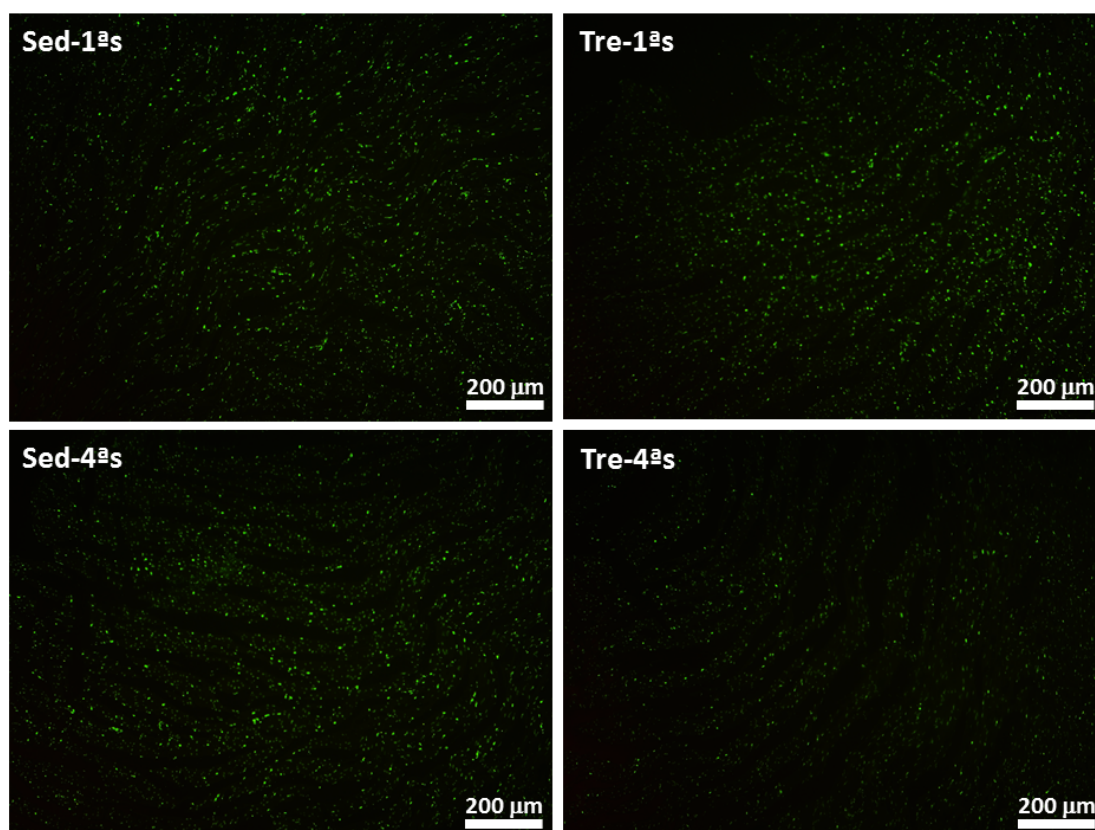


Figura 15. Fotografias de microscopia de fluorescência de cortes do ventrículo esquerdo, tratados com a técnica de tunel, de animais sedentários (Sed) e treinados (Tre), injetados com doxorrubicina, sacrificados na primeira (1ªs) e quarta semanas (4ªs) do protocolo experimental. É de notar o elevado número de núcleos marcados por campo visual nos animais do grupo sedentário (Sed-1ªs e Sed-4ªs). Em Tre-1ªs o número de células marcadas não parece ser tão grande como em Sed-1ªs e em Tre-4ªs este número é ainda mais reduzido.

O efeito cardioprotetor do treino físico é evidenciado pelo facto de, no grupo TRE+DOX, o número de núcleos marcados por campo visual na 2ª, 3ª e 4ª semanas ter sido significativamente inferior aos encontrados na 1ª semana ($p=0,009$), sendo este número de núcleos marcados significativamente inferior ao encontrado no grupo SED+DOX nas 3ª e 4ª semanas ($p=0,009$ nas duas semanas). Na 3ª semana o treino mostrou ainda capacidade de proteção cardíaca, uma vez que, nesta semana, a morte celular foi significativamente inferior à ocorrida na 2ª semana ($p=0,009$). Estes resultados são também ilustrados na figura 15 Tre-4ªs, onde se pode observar que o número de células marcadas é muito reduzido.

Da análise da correlação entre o dano tecidual e morte celular nos animais injetados com doxorubicina, encontrou-se uma correlação positiva, moderada e significativa ($r=0,683$; $p<0,001$). Comparativamente aos animais do grupo veículo, as células danificadas, identificadas com hematoxilina-eosina morrem mais, como seria de esperar. Ou seja, as lesões celulares são mais letais do que as observadas nos animais do grupo veículo.

Para a análise da proliferação celular, foi contabilizado o número de núcleos que incorporaram BrdU por campo visual de 400x (Fig. 16), do mesmo modo que realizado nos animais injetados com veículo.

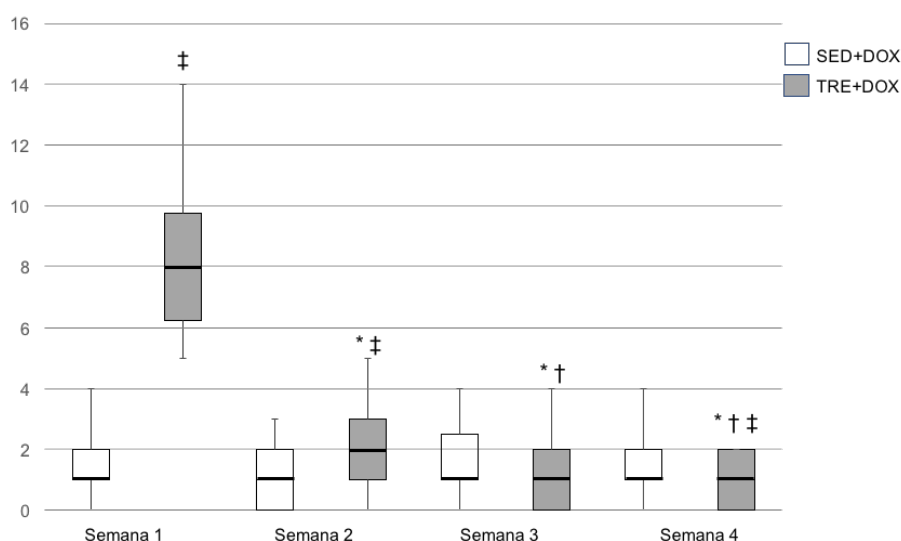


Figura 16. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% do número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorubicina (DOX).

* $p<0,05$ vs. semana 1

† $p<0,05$ vs. semana 2

‡ $p<0,05$ vs. SED+DOX

A proliferação celular observada no grupo SED+DOX não diferiu da encontrada nos animais SED+V ($p>0,05$; ver Fig. 8), tendo-se mantido constante ao longo das 4 semanas.

Nos animais do grupo TRE+DOX, observa-se que a proliferação celular foi muito acentuada na 1ª semana, tendo sido esta mais evidente na proliferação de

células endoteliais seguida de proliferação de cardiomiócitos e fibroblastos (tabela 7). No entanto, o efeito cardioprotetor e de tolerância ao exercício induzido pelo treino verificou-se logo na 2ª semana, dado que a proliferação celular, apesar de ainda ser superior no grupo TRE+DOX ($p=0,001$ vs. SED+DOX), se mostrou muito inferior à encontrada na 1ª semana no mesmo grupo de animais ($p<0,001$ vs. semana 1).

Tabela 7. Valores de mediana (P25%; P75%) de número de núcleos marcados com BrdU de cardiomiócitos, de células endoteliais e de fibroblastos, em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com doxorubicina (DOX).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	P
Cardiomiócitos	SED+DOX	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,457
	TRE+DOX	2,0 (2,0;3,0)	0,0 (0,0;1,0)*	0,0 (0,0;1,0)*	0,0 (0,0;1,0)*	<0,001
	p	<0,001	0,010	0,316	0,883	-----
Células endoteliais	SED+DOX	1,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;1,5)	0,588
	TRE+DOX	4,0 (3,0;5,0)	1,0 (0,0;1,3)*	0,0 (0,0;1,0)*†	0,0 (0,0;1,0)*†	<0,001
	p	<0,001	0,081	0,068	0,005	-----
Fibroblastos	SED+DOX	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,5)	0,744
	TRE+DOX	2,0 (1,0;3,0)	1,0 (0,0;1,0)*	0,0 (0,0;0,0)*†	0,0 (0,0;0,3)*†	<0,001
	p	<0,001	0,040	0,317	0,892	-----

* $p<0,05$ vs. semana 1

† $p<0,05$ vs. semana 2

Esta redução foi notória em todos os tipos de células avaliadas, parecendo ser mais visível na proliferação de cardiomiócitos, que se revelou significativamente inferior à proliferação cardiomiócitos do grupo SED+DOX ($p=0,010$) (tabela 7).

Esta ação do treino físico prolongou-se nas 3ª e 4ª semanas, pois os valores de proliferação celular nestes momentos de avaliação foram significativamente inferiores aos encontrados no grupo SED+DOX, verificando-se que na 3ª semana o número total de núcleos marcados foi significativamente inferior à 2ª semana ($p<0,001$) e na 4ª semana esse número foi inferior ao encontrado no grupo SED+DOX ($p=0,017$).

Nos animais injetados com doxorrubicina analisou-se também a correlação entre o número de núcleos marcados por campo visual com o teste TUNEL e a proliferação celular analisada através do número total de núcleos marcados com BrdU por campo visual, tendo-se encontrado uma correlação fraca positiva e significativa ($r=0,347$; $p=0,028$). Esta correlação foi inferior à encontrada nos animais injetados com veículo, podendo indicar que existem muito mais células que morrem do que a capacidade de proliferação, confirmando a limitação da capacidade regeneração cardíaca.

Na tabela 8 e figura 17, são apresentados os valores de concentração de glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e a razão GSSG/GSHTotal, em micromol/g, encontrados nos homogeneizados cardíacos dos animais injetados com doxorrubicina.

Tabela 8. Valores de mediana (P25%; P75%) das concentrações cardíacas de glutathiona reduzida, oxidada e total (GSH, GSSG, GSHTotal)) em cada semana do protocolo nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE), injetados com doxorrubicina (DOX).

	Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	P
GSH micromol/g	SED+DOX	0,9 (0,7;1,0)	0,8 (0,6;1,0)	0,9 (0,7;1,0)	0,6 (0,5;0,8)	0,293
	TRE+DOX	1,0 (0,8;1,2)	1,2 (1,0;1,5)	1,4 (1,2;1,5)	1,3 (1,2;1,4)	0,095
	p	0,242	0,036	0,009	0,008	----
GSSG micromol/g	SED+DOX	0,4 (0,3;0,4)	0,3 (0,3;0,5)	0,4 (0,3;0,5)	0,4 (0,3;0,4)	0,963
	TRE+DOX	0,5 (0,5;0,6)	0,4 (0,4;0,5)*	0,3 (0,3;0,4)*	0,3 (0,3;0,3) [†]	0,005
	p	0,015	0,347	0,602	0,463	----
GSHTotal micromol/g	SED+DOX	1,5 (0,4;1,7)	1,5 (1,3;1,7)	1,6 (1,5;1,7)	1,4 (1,1;1,6)	0,341
	TRE+DOX	2,0 (1,9;2,3)	2,0 (1,9;2,2)	2,1 (1,9;2,2)	1,9 (1,7;2,1)	0,622
	p	0,012	0,009	0,009	0,009	----

* $p<0,05$ vs. semana 1

[†] $p<0,05$ vs. semana 2

Constata-se que não há variações no tempo na concentração de glutathiona reduzida, oxidada e total nos animais sedentários ($p>0,05$), mantendo-se estes níveis constantes ao longo das 4 semanas. No entanto, no grupo de animais

treinados observa-se uma diminuição da concentração de glutathiona oxidada ($p=0,005$) ao longo das 4 semanas, tendo sido estas mais manifestadas na 3ª semana para a glutathiona reduzida ($p=0,027$ vs. semana 1) e nas semanas 2 e 3 para a glutathiona oxidada ($p=0,036$ vs. semana 1 e $p=0,016$ vs. semana 1). Parece que, o treino físico não favorece o incremento e a tolerância ao exercício (tabela 5, figura 11), no entanto, outros mecanismos protetores, como enzimas antioxidantes ou outros compostos podem estar na origem destes resultados.

Da análise da tabela, verifica-se ainda que as concentrações de glutathiona total foram superiores em todas as semanas do estudo, no grupo de animais treinados ($p=0,012$ vs. SED+DOX, semana 1 e $p=0,009$ vs. SED+DOX, semanas 2, 3 e 4), tendo-se mantido constantes ao longo das 4 semanas.

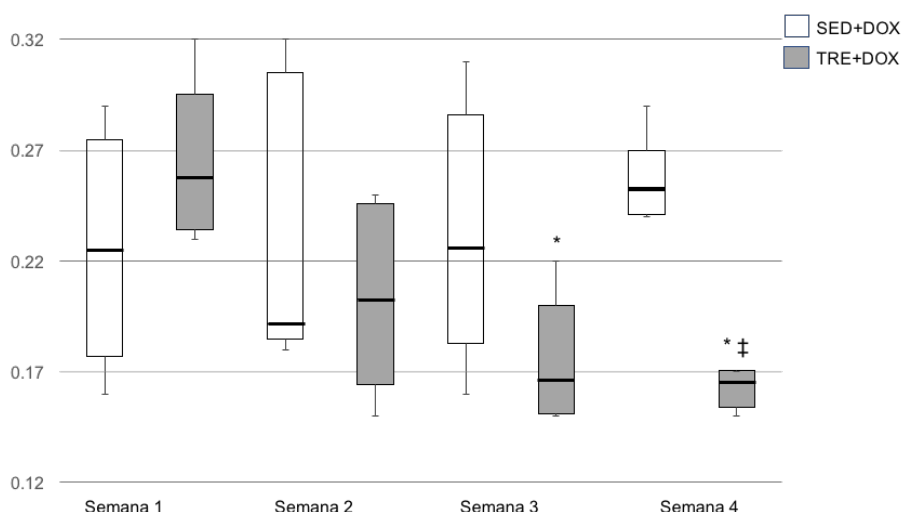


Figura 17. Gráfico de valores de mediana percentil de 25% e 75% da razão glutathiona oxidada (GSSG) / glutathiona total (GSHTotal), em cada semana do protocolo, nos grupos sedentário (SED) e treinado (TRE) injetados com doxorrubicina (DOX).

* $p<0,05$ vs. semana 1

‡ $p<0,05$ vs. SED+DOX

Da análise da figura observam-se pequenas alterações não significativas no stress oxidativo ao longo das 4 semanas nos animais sedentários expostos à DOX, no entanto, quando comparadas com os animais sedentários injetados com veículo (Fig. 11), verifica-se que o stress oxidativo foi muito superior nos

animais injetados com DOX, em todas as semanas ($p=0,009$), evidenciando o efeito pro-oxidante lesivo da doxorrubicina.

No grupo de animais treinados e injetados com doxorrubicina, verifica-se uma redução do stress oxidativo ao longo das 4 semanas ($p=0,013$). Esta diminuição foi observada logo na 3ª semana ($p=0,009$ vs. semana 1), tendo o treino continuado a evidenciar os efeitos cardioprotetores, pois o stress oxidativo na 4ª semana foi significativamente inferior nos animais treinados quando comparados com os animais sedentários ($p=0,009$).

O presente capítulo encontra-se dividido em duas partes, sendo a primeira dedicada à discussão dos aspetos metodológicos e a segunda à discussão dos resultados.

Discussão da metodologia

Uma vez que os animais são extremamente sensíveis às variações ambientais, houve a preocupação de manter os ratos em quarentena durante 10 dias após a sua chegada, permitindo a recuperação do stress causado pelo transporte, assim como a adaptação ao novo ambiente do biotério. Deste modo, estas alterações orgânicas aconteceram durante o período de quarentena, permitindo assim a realização do estudo com animais saudáveis e, dessa forma, impedindo que a recuperação da viagem ou as adaptações ao novo ambiente se tivessem manifestado durante o protocolo experimental e influenciassem os resultados obtidos.

O treino físico foi iniciado com uma primeira semana de adaptação progressiva ao exercício no tapete rolante, com duração e velocidade baixas de início, mas que foram sendo aumentadas gradualmente. Este período permitiu uma adaptação progressiva de modo a atenuar o stress imposto pela exposição a essa nova situação e, assim, proteger os animais de hipotéticos comprometimentos do seu sistema imunológico, situação que poderia influenciar os resultados obtidos (Poole, 1997).

Neste estudo, e à semelhança de outros já realizados (Kwak, 2013b; Lee et al., 2013; Mohan et al., 2015), utilizou-se a técnica de TUNEL como marcador de morte celular, no entanto este método não discrimina se a morte ocorre por apoptose ou autólise (Kano et al., 1999). Apesar de o fabricante (*Roche*) do *kit* o anunciar como um marcador de apoptose pela sua capacidade de deteção da fragmentação de DNA, afirmando que existe discriminação entre apoptose e necrose, na nossa opinião o dano do DNA ocorre também no processo de autólise e necrose. Por esta razão, o TUNEL foi utilizado neste estudo como um indicador de morte celular, sendo este conceito partilhado pela revisão de Huerta et al. (2007). De facto, o TUNEL deve ser apenas considerado como um método

de detecção de dano de DNA mas, quando utilizado com outros marcadores específicos, pode identificar células em apoptose (Loo, 2011).

Para avaliar a proliferação celular utilizámos a técnica imunohistoquímica de detecção de BrdU incorporado no DNA celular, tendo este composto sido diluído na água diária fornecida aos animais (Vukusic et al., 2015), em vez de ter sido injetado por via ip, como utilizado noutros protocolos experimentais (Sanada et al., 2014; Urbanek et al., 2006; Waring et al., 2015; Waring et al., 2014). De referir que esta administração foi realizada durante toda a semana que antecedeu o sacrifício, permitindo-nos assim quantificar o número de células que entraram em ciclo ao longo de todo esse período de tempo. De facto, durante a fase S do ciclo celular, as células vão incorporar, nas suas moléculas de DNA recém-sintetizadas, o BrdU disponível, em competição com a desoxi-timidina, passando estes ácidos nucleicos para as células filhas, situação que permite a sua identificação com anticorpos específicos. Como a administração do BrdU foi realizada em doses baixas (1mg/ml), em todos os grupos de animais, a hipótese de se ter verificado toxicidade deste composto é reduzida, mas, caso realmente tenha existido, ela terá sido similar nos dois grupos, não comprometendo as diferenças entre grupos induzidas pelas variáveis independentes em estudo. Para quantificação das células em proliferação poderiam ter sido identificados outros antigénios celulares expressos durante a divisão celular, como por exemplo o Ki67 (Ellison et al., 2013; Kajstura, Urbanek, et al., 2010; Waring et al., 2015). Contudo, importa realçar que, desta forma, apenas conseguiríamos identificar o número de células em divisão naquele preciso momento, perdendo-se toda a informação referente ao restante período prévio da semana. O mesmo aconteceria caso o BrdU tivesse sido administrado por via ip, 1 ou 3 dias antes do sacrifício dos animais, como acontece noutros estudos com animais (Bostrom et al., 2010).

Para a análise histológica, considerando a heterogeneidade morfológica e funcional dos cardiomiócitos ao longo do músculo cardíaco, optámos pela realização de múltiplos cortes seriados, abrangendo várias zonas do coração, permitindo assim ter uma noção mais global e mais aproximada do que acontece no músculo cardíaco como um todo. A quantificação das lesões, de carácter

semi-quantitativo, foi realizada de forma cega por um indivíduo com experiência, dando consistência aos dados para posterior análise. Esta metodologia já foi seguida por outros investigadores (Ascensao et al., 2005; Chatterjee et al., 2000; Chen et al., 2003; Dinis-Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2005) para a quantificação da severidade da degeneração e infiltração celular, da organização tecidual e identificação de zonas de necrose.

Para quantificação dos níveis de stress oxidativo, optámos por dosar as concentrações de GSH e de GSSG, como frequentemente utilizado na literatura (Carvalho, Milhazes, et al., 2004; Vandeputte et al., 1994) uma vez que a relação entre estes dois compostos é considerada a metodologia mais representativa dos níveis de stress oxidativo tecidual. É sabido que o aumento do stress oxidativo tem um papel importante na patologia cardíaca, sobretudo relacionado com a perda de cardiomiócitos por necrose e/ou apoptose (Buttke & Sandstrom, 1994; Kajstura et al., 1996; Pollack & Leeuwenburgh, 2001; Yuan et al., 2003), sendo por isso pertinente o seu estudo. Por limitações técnicas, não foram avaliados marcadores de dano oxidativo, os quais normalmente variam de forma paralela com as variações dos níveis de stress oxidativo tecidual. Não consideramos a sua não avaliação como uma limitação do nosso estudo porque, caso tivessem sido avaliados, não trariam informação adicional pertinente, constituindo apenas como mais um reforço da participação do stress oxidativo na fisiopatologia do dano cardíaco induzido pela DOX, já testemunhado pela relação GSSG/GSH total.

O colagénio é um componente importante da matriz intersticial do miocárdio, sendo responsável pela organização estrutural tecidual, pelo suporte dos cardiomiócitos e microcirculação coronária e pela transmissão das tensões mecânicas geradas durante a contração (Mendes et al., 2012; Susman et al., 2002). No presente estudo, a quantificação do colagénio foi efetuada pela técnica de *sirius red* e expressa em função da percentagem de área ocupada. Esta técnica histoquímica é já utilizada há muitas décadas e considerada efetiva para a coloração do colagénio tecidual (Dapson et al., 2011; Junqueira et al., 1979; Puchtler et al., 1964). De notar que no nosso trabalho a deposição de colagénio apenas foi avaliada no grupo de animais injetados com veículo, apesar

de ser sabido que existe um aumento da deposição desta proteína na sub-região pericárdica, originado pela administração da DOX, devido à diminuição da contractilidade ventricular (Caulfield & Bittner, 1988). No entanto, no presente estudo não era expectável encontrar alterações nesta proteína, dado que o sacrifício ocorreu 24h após a administração da DOX.

Foi administrada por via ip uma dose única de DOX com o objetivo de avaliar o grau de cardioproteção induzido pelo exercício físico, à semelhança dos procedimentos utilizados noutros estudos (Ascensao et al., 2005; Kavazis et al., 2014; Werner et al., 2008). É sabido que a DOX induz cardiotoxicidade (Carvalho et al., 2014; Pereira et al., 2011), como por exemplo alterações eletrofisiológicas cardíacas (Singal & Iliskovic, 1998), sendo também descritos efeitos crónicos colaterais mais sérios e irreversíveis, como a cardiomiopatia e a insuficiência cardíaca congestiva (Alexander et al., 1979; Pereira et al., 2011). A dose de DOX administrada foi suficiente para induzir algum dano controlado e morte de apenas algumas células sem, contudo, provocar a morte dos animais. Esta toxicidade seletiva da DOX demonstra as diferentes suscetibilidades celulares dentro do órgão, situação que pode ser explicada pelas diferentes idades dos cardiomiócitos que o compõem.

O facto de se ter realizado um estudo longitudinal, com um protocolo de 4 semanas e sacrifício de animais no final de cada semana, possibilitou acompanhar a evolução ao longo do tempo, em oposição aos estudos de Ascensao et al. (2005), Kavazis et al. (2014) e Werner et al. (2008), onde o sacrifício dos animais foi realizado apenas no final do protocolo experimental, não permitindo o acompanhamento da evolução temporal da tolerância induzida pelo treino, quer ao exercício físico diário, quer à administração da DOX.

Finalmente, para a análise de dados recorreu-se à estatística não paramétrica pois, para além das diferentes variáveis descontínuas, a distribuição das variáveis contínuas também não seguia uma distribuição normal. Para comparação intragrupal das variáveis ao longo das 4 semanas, utilizou-se o teste *Kruskal-Wallis*, que permite comparar dados de 3 ou mais amostras independentes, ordenando os resultados para cada um dos casos e calculando

em seguida a média das ordens para cada amostra. Sempre que da análise deste teste se observavam diferenças estatisticamente significativas entre as 4 semanas, recorreu-se ao teste *Mann-Whitney* de modo a determinar entre que momentos essas diferenças eram de facto evidenciadas. As comparações intergrupais também foram realizadas com recurso à estatística não paramétrica, utilizando para o efeito o teste *Mann-Whitney*, que permite a comparação de resultados entre duas amostras independentes (Corder & Foreman, 2009). Desta forma, face à distribuição não normal das variáveis, bem como à utilização da estatística inferencial não paramétrica, optámos pela utilização da mediana e dos percentis 25% e 75% como medida de tendência central e de dispersão, respetivamente.

Discussão dos resultados

Os resultados deste estudo demonstraram que o treino, nas suas fases iniciais, induz em animais sedentários alterações estruturais acentuadas ao nível do músculo cardíaco, as quais, atenuando-se na 3ª e 4ª semanas do protocolo experimental, revelam uma tolerância progressiva deste órgão à exigência funcional imposta por cada sessão de exercício agudo assim como, paralelamente, uma tolerância cruzada à ação cardiotóxica da doxorubicina.

Com base nas características gerais apresentadas pelos animais nos diferentes momentos de avaliação, podemos dizer que o peso destes aumentou ao longo das 4 semanas do protocolo experimental, com uma evolução semelhante nos dois grupos estudados. Considerando a maior atividade física imposta aos animais do grupo treinado, seria de esperar que o peso destes evoluísse mais lentamente, atendendo a que nenhum dos grupos foi sujeito a restrição calórica e os animais do grupo sedentário tiveram, teoricamente, um menor gasto energético diário (Ciolac & Greve, 2011; Sene-Fiorese et al., 2008). No entanto, a variação do peso dos animais deve ser vista como um indicador grosseiro do seu processo de desenvolvimento, sendo resultado da contribuição relativa dos diferentes órgãos/tecidos, tendo-se verificado que o desenvolvimento dos animais treinados foi semelhante ao dos sedentários, sem que o treino se tenha,

aparentemente, manifestado como um agente de stress fisiológico. Também se verificou que o peso relativo dos ventrículos não diferiu nos dois grupos, tal como seria de esperar, uma vez que é sabido que a hipertrofia cardíaca depende da natureza, duração e intensidade do exercício (Barbier et al., 2006; Bostrom et al., 2013) e, no presente estudo, o exercício realizado foi de intensidade moderada e implementado de forma gradual, caracterizado hemodinamicamente por um aumento da pré-carga com diminuição da pós-carga (Haizlip et al., 2012).

Evidências de tolerância cardíaca ao exercício agudo induzida pelo treino físico

No grupo de animais sedentários injetados com veículo não foram observadas alterações histológicas significativas no músculo cardíaco ao longo do estudo. No entanto, pontualmente em células isoladas, foram visíveis algumas alterações de dilatação e/ou vacuolização celular, de severidade muito reduzida, sendo estas alterações explicadas pelo processo normal de desgaste pelo uso (Leri et al., 2011; Torella et al., 2007). O aumento da tensão mecânica, do stress metabólico ou da temperatura são condições que conduzem ao desgaste natural dos órgãos, porém, como os resultados demonstram, a susceptibilidade das células face à exigência funcional basal não é a mesma, quer pelo facto de as células terem idades diferentes, quer pela sua diferente capacidade adaptativa. Nestes animais sedentários, os resultados também ilustram a contínua substituição de cardiomiócitos e células endoteliais que degeneram e morrem diariamente, sendo expectável que esta reposição celular não seja total pois só assim se justifica a ocorrência do envelhecimento orgânico, caracterizado por uma incapacidade progressiva de manutenção da estrutura e função máxima cardíacas, com hipertrofia progressiva dos cardiomiócitos sobreviventes, inflamação e desenvolvimento gradual de fibrose (Kwak, 2013a; Meschiari et al., 2017). De facto, existe evidência que o envelhecimento do coração de seres humanos (Olivetti et al., 1995; Olivetti et al., 1991) e animais (Anversa et al., 1986; Anversa et al., 1990) se caracteriza pela perda progressiva de miócitos e hipertrofia reativa dos que sobrevivem. A diminuição do número de miócitos ocorre em estádios precoces da idade cronológica, mesmo na ausência de

patologia (Anversa et al., 1990; Kajstura et al., 1996; Olivetti et al., 1995; Olivetti et al., 1991). Olivetti et al. (1991); Olivetti et al. (1995), demonstraram que um indivíduo do gênero masculino saudável, aos 70 anos, perdeu aproximadamente 30% dos seus miócitos, indicando que a morte celular ocorre com a idade, mesmo na ausência de patologia cardíaca subjacente.

Se o coração fosse, de facto, um órgão pós-mitótico e os miócitos que vão morrendo diariamente não fossem substituídos, rapidamente se tornaria disfuncional. Contudo, isso não acontece porque há células que proliferam e contribuem para a sua substituição (Anversa & Nadal-Ginard, 2002; Kajstura et al., 1998), tendo os miócitos ventriculares humanos capacidade de reentrar no ciclo celular e sintetizar DNA (Beltrami et al., 1997). Deste modo, a presença de *stem cells* no miocárdio, com capacidade de proliferação quando expostas a estímulos específicos (Anversa, Kajstura, et al., 2006), em paralelo com células *stem* oriundas da medula óssea que infiltram o coração (Kajstura, Urbanek, et al., 2010; Segers & Lee, 2008), explica a capacidade de regeneração cardíaca e, conseqüentemente, a sua habilidade de fazer face às exigências funcionais do dia-a-dia.

Assim, os resultados do presente estudo reforçam a atual teoria da renovação de cardiomiócitos, uma vez que é sabido que no indivíduo adulto existe um *turnover* anual de cardiomiócitos que pode variar de 1 a 10% (Bergmann et al., 2009; Senyo et al., 2013). Estes achados são ainda reforçados pelo facto de, no grupo de animais sedentários injetados com veículo, a taxa de morte e proliferação celular encontrada ao longo das 4 semanas ter sido constante e muito reduzida, sendo mais evidente nas células endoteliais do que nos cardiomiócitos.

No entanto, no grupo de animais treinados injetados com veículo, verificou-se um aumento acentuado do dano tecidual logo na primeira semana, com uma maior incidência de morte celular, atingindo predominantemente células endoteliais, mas também muitos cardiomiócitos. É sabido que o exercício constitui um veículo de stress fisiológico para o organismo, em geral, e para o sistema cardiovascular, em particular, com stress celular mecânico, metabólico,

térmico e oxidativo (Hawley et al., 2014). De facto, no que respeita ao coração, Legaz-Arrese et al. (2011) e Kim et al. (2014) observaram elevações dos níveis séricos de biomarcadores de dano cardíaco, após exercícios prolongados, de intensidade moderada, em indivíduos aparentemente saudáveis, sugerindo a morte pontual de cardiomiócitos sem qualquer sintomatologia clínica. Também no nosso trabalho, apesar de se ter realizado um aumento progressivo da carga de treino na primeira semana do protocolo, foi observado que, aparentemente, as células não estavam todas igualmente preparadas para tolerar este aumento da exigência funcional imposta pelos repetidos exercícios agudos, mesmo tendo sido realizados com intensidade suave. Como seria de esperar, este dano e morte celular observados na primeira semana foram acompanhados por uma maior proliferação celular de células endoteliais, de cardiomiócitos e de fibroblastos, evidenciada pelos resultados do BrdU. Estes resultados mostram inequivocamente que a taxa de renovação celular no músculo cardíaco não é fixa, parecendo depender da taxa de morte dos vários tipos de células, a qual, por sua vez, está dependente da exigência funcional que lhes é imposta e da sua preparação prévia para suportar essa exigência. Na realidade, o aumento da atividade física exige mais trabalho ao sistema cardiovascular (Laughlin & McAllister, 1992), induzindo um aumento do dano mas também um aumento da proliferação celular com o objetivo de repor a homeostasia.

Curiosamente, na segunda semana do protocolo, nos animais sujeitos a treino físico, houve uma diminuição acentuada dos marcadores de dano tecidual e de morte celular, enquanto que nas 3^a e 4^a semanas eles retomaram os valores idênticos aos encontrados nos animais sedentários. Os resultados de morte celular, encontrados no nosso estudo vão de encontro aos descritos por Jin et al. (2000), tendo estes verificado que o treino melhora a função cardíaca sem evidência de apoptose, apresentando a expressão genética dos cardiomiócitos uma adaptação distinta da encontrada em condições patológicas.

Sabe-se que o exercício físico induz uma variedade de estímulos mecânicos e metabólicos às células cardíacas e que este mesmo exercício reproduzido no tempo, a longo prazo, induz adaptações crónicas que tornam as células mais tolerantes às exigências impostas por cada exercício físico. Esta tolerância é

normalmente explicada pelas alterações metabólicas crônicas consequentes da reprogramação de expressão genética dos cardiomiócitos existentes, tais como aumento da densidade e funcionalidade de organelos, tais como mitocôndrias, aumento da síntese e expressão de proteínas de stress, elevação de expressão de enzimas chave do metabolismo energético (Laufs et al., 2004; Wilson et al., 2015), assim como melhoria das defesas antioxidantes (Powers, Sollanek, et al., 2014). Outros autores, como Waring et al. (2014), descrevem ainda a existência da hipertrofia de cardiomiócitos, situação que não foi verificada no presente estudo. Contudo, os nossos resultados sugerem que o aumento da exigência funcional cardíaca imposta pelo exercício agudo pode também atuar como um agente naturalmente seletivo, induzindo a morte das células mais vulneráveis com a sua consequente substituição por células jovens, mais funcionais, sendo este *turnover* celular, em paralelo com as adaptações crônicas nos cardiomiócitos sobreviventes, mais um contributo para tornar o órgão mais apto e mais tolerante às alterações homeostáticas induzidas pelo exercício agudo. Os nossos resultados mostram que o exercício regular promove o aumento da renovação dos miócitos, assim como de células endoteliais e fibroblastos, através da formação de novos cardiomiócitos, aumento do número e diferenciação das CSCs e das células da medula óssea (Ellison et al., 2012). Desta forma, podemos sugerir que as diferenças de idades cronológicas entre células cardíacas de animais sedentários parecem ser atenuadas com o treino, havendo um “rejuvenescimento” do coração.

No que concerne à quantificação de colagénio, na comparação intergrupar, o grupo de animais treinados evidenciou uma maior síntese e deposição desta proteína comparativamente aos sedentários. Espera-se que, em condições normais, a abundância do colagénio comparativamente ao tecido muscular cardíaco de animais sedentários seja relativamente baixa (Kanzaki et al., 2012; McMullen & Jennings, 2007). O aumento da percentagem de colagénio encontrada no grupo de animais treinados, poderá ser explicada pelas alterações homeostáticas induzidas pelos vários exercícios agudos, particularmente com o aumento do stress mecânico, que ocorreu durante todo o protocolo, assim como com o aumento do dano e morte celular, com a

consequente resposta inflamatória, que ocorreu nas duas primeiras semanas. De facto, num período inicial, os exercícios repetidos no tempo induziram uma resposta inflamatória, que ocorreu para promover a reparação tecidual com o objetivo de restaurar a homeostasia, a qual, por sua vez, promove também a ativação fibroblástica. A síntese de moléculas de colagénio, consequente da ativação de fibroblastos, contribui para a reparação tecidual (Kwak, 2013a; Pedersen et al., 1998), podendo estes fenómenos, de dano, inflamação e reparação tecidual, explicar o aumento de colagénio encontrado nos animais treinados logo nas primeiras semanas do protocolo experimental. De notar que acumulação excessiva de tecido conjuntivo tem um efeito nefasto na função cardíaca, afetando negativamente a complacência, promovendo arritmias e prejudicando a difusão do oxigênio para os cardiomiócitos (Harvey & Leinwand, 2011; Moreo et al., 2009). De facto, o acúmulo excessivo de tecido conjuntivo pode provocar aumento da rigidez do miocárdio e limitar a eficiência contrátil sistólica (Weber et al., 1996). No entanto, no nosso estudo, o acréscimo de colagénio observado nos animais treinados foi suave, devendo ser interpretado como um mecanismo necessário de proteção para fazer face à maior tensão mecânica gerada durante os exercícios físicos.

O músculo cardíaco parece ser bastante suscetível ao stress oxidativo induzido pelo exercício físico agudo (Atalay & Sen, 1999; Ji, 1995), contudo os resultados encontrados nos animais treinados parecem não ser explicados pelo stress oxidativo, uma vez que não foram encontradas alterações na relação GSSG/GSHTotal. Assim, pode-se pensar que as alterações associadas ao dano, morte e proliferação celular estejam predominantemente associadas à sobrecarga metabólica, mecânica ou térmica dos cardiomiócitos. Por outro lado, o tecido muscular cardíaco, quando sujeito a estímulos de natureza crónica, parece sensível a um conjunto de adaptações, tendo o treino de resistência, um papel importante no aumento da tolerância cardíaca ao stress oxidativo.

Desde a década de 70 do século passado que é sabido que o aumento do trabalho muscular acarreta uma elevação dos biomarcadores de dano oxidativo em vários órgãos e tecidos, quer em humanos, quer em animais (Brady et al., 1979; Dillard et al., 1978). Posteriormente, vários estudos demonstraram que o

exercício de endurance prolongado ou exercício de curta duração e de alta intensidade resultam num aumento de biomarcadores de stress oxidativo, tendo Novelli et al. (1990) e Shindoh et al. (1990) descoberto que a produção de EROs contribuiu para o aparecimento da fadiga muscular em animais. Concretamente no coração, também existem muitas evidências na literatura de que o exercício físico aumenta os níveis de stress e dano oxidativo cardíaco (Ascensao et al., 2003), uma vez que se estima que cerca de 2-5% do O₂ consumido resulta na produção de EROs e que um aumento da taxa metabólica que decorre do exercício físico, com aumento da temperatura orgânica, é um fator predisponente para a produção acrescida de EROs ao nível das mitocôndrias, induzindo lesão oxidativa tecidual. Comparativamente com estes estudos, no nosso trabalho não procurámos estudar a ocorrência de stress oxidativo após exercícios agudos. O que pretendemos foi observar os níveis basais, de repouso, de stress oxidativo e não observámos qualquer aumento do stress oxidativo nestas condições induzido pelo treino, provavelmente porque, como a carga de treino a que os animais foram sujeitos foi relativamente baixa, dois dias de intervalo entre o último exercício e o momento do sacrifício terão sido suficientes para uma recuperação total no grupo treinado. Para além disso, espera-se também que a capacidade de recuperação destes animais treinados seja muito alta por aumento das suas defesas antioxidantes, quer no músculo esquelético, quer no músculo cardíaco (Powers et al., 1994; Powers et al., 1993), favorecendo rapidamente o retorno aos valores normais da relação GSSG/GSH total.

Evidências de tolerância cardíaca à doxorrubicina induzida pelo treino físico

O presente estudo fornece evidência de que a doxorrubicina resulta em graves distúrbios histológicos no coração de animais saudáveis. A estrutura da DOX permite a sua ligação ao DNA, impedindo a síntese de DNA, de RNA ou de ambos, provocando a rutura das cadeias de DNA e interferindo com os processos de replicação e transcrição. Devido à sua ação como inibidora da topoisomerase II (Menna et al., 2012), à formação de radicais livres semiquinona e de radicais de oxigénio responsáveis pelo aumento dos níveis de stress

oxidativo e peroxidação lipídica, entre outros, a DOX tem uma potente ação citotóxica em vários órgãos, mas especialmente no coração (Raj et al., 2014). Esta droga, pode ainda ligar-se às membranas celulares alterando a sua fluidez e capacidade de transporte de iões (Raj et al., 2014; Takemura & Fujiwara, 2007) determinantes para a manutenção da homeostasia celular. Simunek et al. (2009), referem que existem 3 importantes razões que explicam o facto de o coração ser o principal alvo de toxicidade da DOX (i) a sua abundância em mitocôndrias, situação que pode aumentar significativamente a produção de EROs; (ii) os menores níveis de enzimas catalase e glutathione peroxidase, comprometendo a atividade antioxidante cardíaca; (iii) a maior capacidade cardíaca de reter antraciclina, comparativamente aos restantes tecidos (Simunek et al., 2009).

De facto, o coração é o principal alvo das antraciclina, provavelmente devido à abundância de mitocôndrias neste tecido, o que pode aumentar significativamente a produção de EROs (Berthiaume & Wallace, 2007; Simunek et al., 2009) cujo efeito tóxico é elevado (Melov et al., 1999). Simultaneamente a cardiotoxicidade induzida pela DOX diminui o nível de antioxidantes (Li et al., 2002; Takemura & Fujiwara, 2007) relacionado com a síntese indireta do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e a atividade enzimática. A DOX pode ainda, induzir atrofia dos cardiomiócitos (Li et al., 2006; Zhu et al., 2009), pela diminuição da síntese proteica (Glass, 2005; Powers et al., 2005), inibição da atividade das bombas de cálcio dependentes de ATP resultando num aumento da sua concentração no citosol (Saeki et al., 2002). Em humanos, esta cardiotoxicidade da DOX expressa-se clinicamente por hipotensão, taquicardia, insuficiência cardíaca congestiva e cardiomiopatia dilatada (Berthiaume & Wallace, 2007; Carvalho et al., 2014). Sabe-se que a descontinuação da administração da DOX, pode reverter os efeitos agudos nefastos, deixando de se verificar as arritmias, a taquicardia e a hipotensão (Pereira et al., 2011; Takemura & Fujiwara, 2007), no entanto, a longo prazo, a administração da DOX induz alterações crónicas irreversíveis nos cardiomiócitos, podendo levar à insuficiência cardíaca (Takemura & Fujiwara, 2007).

Um ponto interessante dos nossos resultados foi o facto de os cardiomiócitos dos animais treinados não responderem de igual forma à DOX ao longo do estudo, tendo-se verificado uma grande heterogeneidade intragrupal em termos de resposta celular. Assim, enquanto que os animais sedentários apresentaram sérios danos estruturais em todas as semanas, com níveis de intensidade similares, os animais treinados, a partir da segunda semana, mostraram uma acentuada diminuição do dano e morte celular, bem como da proliferação celular. Em geral, na literatura, esta tolerância cruzada à DOX induzida pelo treino físico é explicada por vários mecanismos, entre os quais se conta a melhoria de sistemas de defesa antioxidante com redução do stress oxidativo (Ascensao et al., 2005), o aumento da síntese de proteínas de choque térmico (Harris & Starnes, 2001; Moran et al., 2005), a redução da produção de $ON^{\cdot-}$ (Akita et al., 2007; Babai et al., 2002; Hajnal et al., 2005; Nicholson et al., 2013), o aumento de expressão mitocondrial dos K_{ATP} (Brown et al., 2005; Quindry et al., 2012; Quindry et al., 2010), a diminuição da taxa de produção de EROs (Esposito et al., 2011; Farah et al., 2013; Frasier et al., 2013; French et al., 2008; Hamilton et al., 2003; Yamashita et al., 1999) e ativação do sistema de opióides (Dickson et al., 2008; Galvao et al., 2011; Michelsen et al., 2012). No entanto, é importante realçar que estas alterações que podem explicar o efeito cardioprotetor induzido pelo treino, estão relacionadas com a melhoria da funcionalidade das células sobreviventes. Contudo, está também descrito que o exercício repetido no tempo favorece a apoptose de células cardíacas danificadas, através da ativação de mediadores apoptóticos como o Bax, citocromo c, caspase-3 clivada em cardiomiócitos (Huang et al., 2009), observação que os nossos resultados corroboram, assim como o aumento da circulação das células precursoras cardíacas (Adams et al., 2004; Cesari et al., 2012; Guo et al., 2016), ou seja, há indicadores indiretos da literatura que suportam a existência de uma maior taxa de *turnover* celular com o treino físico, evidenciada de forma direta pelos nossos resultados.

Assim, em paralelo com as alterações intracelulares descritas acima, induzidas de forma crónica pelo treino, podemos especular que o exercício agudo, através do aumento de exigência funcional imposta às células cardíacas, atua como um

processo de seleção natural, promovendo a morte das células mais disfuncionais e menos aptas para tolerar essa exigência, com a sua substituição por células jovens, mais funcionais e com maior capacidade adaptativa. Isto significa que, em paralelo com as alterações bioquímicas intracelulares explicativas da cardioproteção, os nossos resultados sugerem que o aumento do *turnover* celular deverá ser também considerado um importante mecanismo de cardioproteção induzido pelo treino físico. Esta tolerância cruzada induzida pelo treino físico é observada não só para estímulos químicos, como a DOX, mas também para outros estímulos nefastos de diferentes naturezas, tais como a IR (Calvert et al., 2011; Powers et al., 1998; Powers et al., 2008) e o enfarte do miocárdio (Freimann et al., 2005).

No presente estudo observamos que o stress oxidativo após administração da DOX, nos animais treinados, diminuiu na 3ª semana, tendo na 4ª semana sido muito inferior ao dos animais sedentários. Estes menores níveis de stress oxidativo poderão ser explicados pelo aumento da expressão e funcionalidade de outros sistemas antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, como por exemplo a glutathione redutase e a catalase, cuja expressão está aumentada com o treino físico (Frasier et al., 2013; Frasier, Sloan, et al., 2011; Powers, Smuder, et al., 2014), as quais têm capacidade de catalisar reações que levam à produção de espécies menos reativas ou à neutralização dos EROs (Powers et al., 1999). Para além destas enzimas, existem ainda outras substâncias antioxidantes não enzimáticas, tais como a vitamina C e E e o ácido fólico, que também possuem capacidade determinante na neutralização e atenuação dos efeitos induzidos pela produção de EROs, que também podem ter sido incrementadas com o treino físico, tal como descrito na literatura (Sen, 2001). Deste modo, espera-se ter havido uma melhoria das defesas antioxidantes, que não são possíveis de detetar apenas com a medição da GSSG e da GSH, que atuaram na proteção do stress oxidativo induzido pela DOX.

Tudo indica que o treino físico realizado, pelo conjunto de adaptações cardíacas a curto e a longo prazo que induziu, quer ao nível da taxa de *turnover* celular, quer ao nível da hipotética melhoria das defesas antioxidantes, aumentou progressivamente a tolerância cardíaca aos exercícios agudos efetuados,

garantindo ainda estas adaptações o aparecimento de tolerância cruzada à DOX.

CONCLUSÕES

Tendo por base os objetivos e os resultados obtidos neste trabalho, é possível formular as seguintes conclusões:

As células cardíacas não têm todas a mesma capacidade de restabelecimento homeostático, evidenciando diferentes suscetibilidades às exigências funcionais diárias assim como ao efeito tóxico da doxorubicina;

O exercício agudo pela exigência funcional que induz ao coração parece funcionar como um discriminador dos cardiomiócitos mais disfuncionais;

O exercício inabitual aumenta a taxa de mortalidade e de proliferação dos cardiomiócitos, das células endoteliais e dos fibroblastos do coração e o treino físico diminuiu no tempo esta taxa, aumentando a tolerância ao exercício agudo. Esta tolerância manifesta-se entre a primeira e a segunda semana de treino, e não está associada com alterações de stress oxidativo;

O treino físico, a partir da 2ª semana, aumenta a tolerância cardíaca à doxorubicina, sendo esta mais acentuada na 3ª e 4ª semanas.

BIBLIOGRAFIA

-
- Adams, V., Jiang, H., Yu, J. T., Mobius-Winkler, S., Fiehn, E., Linke, A., Weigl, C., Schuler, G., & Hambrecht, R. (1999). Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(4), 959-965.
- Adams, V., Lenk, K., Linke, A., Lenz, D., Erbs, S., Sandri, M., Tarnok, A., Gielen, S., Emmrich, F., Schuler, G., & Hambrecht, R. (2004). Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(4), 684-690.
- Adams, V., Linke, A., Breuckmann, F., Leineweber, K., Erbs, S., Krankel, N., Brocker-Preuss, M., Woitek, F., Erbel, R., Heusch, G., Hambrecht, R., Schuler, G., & Mohlenkamp, S. (2008). Circulating progenitor cells decrease immediately after marathon race in advanced-age marathon runners. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15(5), 602-607.
- Akita, Y., Otani, H., Matsuhisa, S., Kyoi, S., Enoki, C., Hattori, R., Imamura, H., Kamihata, H., Kimura, Y., & Iwasaka, T. (2007). Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(5), H2051-2059.
- Albert, C. M., Mittleman, M. A., Chae, C. U., Lee, I. M., Hennekens, C. H., & Manson, J. E. (2000). Triggering of sudden death from cardiac causes by vigorous exertion. *N Engl J Med*, 343(19), 1355-1361.
- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, 25(2), 218-224.
- Alexander, J., Dainiak, N., Berger, H. J., Goldman, L., Johnstone, D., Reduto, L., Duffy, T., Schwartz, P., Gottschalk, A., & Zaret, B. L. (1979). Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiocardiology. *N Engl J Med*, 300(6), 278-283.
- Allen, D. L., Linderman, J. K., Roy, R. R., Bigbee, A. J., Grindeland, R. E., Mukku, V., & Edgerton, V. R. (1997). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 1), C579-587.
- American College of Sports, M., Chodzko-Zajko, W. J., Proctor, D. N., Fiatarone Singh, M. A., Minson, C. T., Nigg, C. R., Salem, G. J., & Skinner, J. S. (2009). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc*, 41(7), 1510-1530.
- Anversa, P., Hiler, B., Ricci, R., Guideri, G., & Olivetti, G. (1986). Myocyte Cell Loss and Myocyte Hypertrophy in the Aging Rat-Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 8(6), 1441-1448.
- Anversa, P., & Kajstura, J. (1998). Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*, 83(1), 1-14.
- Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A., & Bolli, R. (2006). Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*, 113(11), 1451-1463.
- Anversa, P., Kajstura, J., Rota, M., & Leri, A. (2013). Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest*, 123(1), 62-70.
-

-
- Anversa, P., Leri, A., & Kajstura, J. (2006). Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol*, 47(9), 1769-1776.
- Anversa, P., & Nadal-Ginard, B. (2002). Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*, 415(6868), 240-243.
- Anversa, P., Palackal, T., Sonnenblick, E. H., Olivetti, G., Meggs, L. G., & Capasso, J. M. (1990). Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res*, 67(4), 871-885.
- Arbab-Zadeh, A., Perhonen, M., Howden, E., Peshock, R. M., Zhang, R., Adams-Huet, B., Haykowsky, M. J., & Levine, B. D. (2014). Cardiac remodeling in response to 1 year of intensive endurance training. *Circulation*, 130(24), 2152-2161.
- Ascensao, A., Ferreira, R., & Magalhaes, J. (2007). Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol*, 117(1), 16-30.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J., Oliveira, J., & Duarte, J. A. (2003). Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol*, 22(5), 651-678.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J. M. C., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., Oliveira, P. J., & Duarte, J. A. (2005). Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), H722-H731.
- Atalay, M., Lappalainen, J., & Sen, C. K. (2006). Dietary antioxidants for the athlete. *Curr Sports Med Rep*, 5(4), 182-186.
- Atalay, M., & Sen, C. K. (1999). Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Ann N Y Acad Sci*, 874, 169-177.
- Babai, L., Szigeti, Z., Parratt, J. R., & Vegh, A. (2002). Delayed cardioprotective effects of exercise in dogs are aminoguanidine sensitive: possible involvement of nitric oxide. *Clin Sci (Lond)*, 102(4), 435-445.
- Balmer, G. M., & Riley, P. R. (2012). Harnessing the potential of adult cardiac stem cells: lessons from haematopoiesis, the embryo and the niche. *J Cardiovasc Transl Res*, 5(5), 631-640.
- Barbier, J., Lebillier, E., Ville, N., Rannou-Bekono, F., & Carre, F. (2006). Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 13(1), 115-121.
- Bartzeliotou, A. I., Margeli, A. P., Tsironi, M., Skenderi, K., Bacoula, C., Chrousos, G. P., & Papassotiriou, I. (2007). Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clin Biochem*, 40(11), 765-770.
- Bearzi, C., Leri, A., Lo Monaco, F., Rota, M., Gonzalez, A., Hosoda, T., Pepe, M., Qanud, K., Ojaimi, C., Bardelli, S., D'Amario, D., D'Alessandro, D. A., Michler, R. E., Dimmeler, S., Zeiher, A. M., Urbanek, K., Hintze, T. H., Kajstura, J., & Anversa, P. (2009). Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37), 15885-15890.
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R. W., Lecapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A. P., D'Alessandro, D. A., Zias, E., Quaini, F.,
-

-
- Urbanek, K., Michler, R. E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A., & Anversa, P. (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(35), 14068-14073.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., & Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6), 763-776.
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A., & Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 344(23), 1750-1757.
- Beltrami, C. A., Di Loreto, C., Finato, N., Rocco, M., Artico, D., Cigola, E., Gambert, S. R., Olivetti, G., Kajstura, J., & Anversa, P. (1997). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA synthesis and mitosis in myocytes following cardiac transplantation in man. *J Mol Cell Cardiol*, 29(10), 2789-2802.
- Beltrami, C. A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G. A., Puricelli, C., Cigola, E., Quaini, F., Sonnenblick, E. H., Olivetti, G., & Anversa, P. (1994). Structural Basis of End-Stage Failure in Ischemic Cardiomyopathy in Humans. *Circulation*, 89(1), 151-163.
- Benito, B., Gay-Jordi, G., Serrano-Mollar, A., Guasch, E., Shi, Y., Tardif, J. C., Brugada, J., Nattel, S., & Mont, L. (2011). Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation*, 123(1), 13-22.
- Benjamin, I. J., & McMillan, D. R. (1998). Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 83(2), 117-132.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., & Frisen, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324(5923), 98-102.
- Berthiaume, J. M., & Wallace, K. B. (2007). Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol*, 23(1), 15-25.
- Billingham, M. E., Mason, J. W., Bristow, M. R., & Daniels, J. R. (1978). Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep*, 62(6), 865-872.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., Gordon, N. F., & Paffenbarger, R. S. (1992). How Much Physical-Activity Is Good for Health. *Annual Review of Public Health*, 13, 99-126.
- Boni, A., Urbanek, K., Nascimbene, A., Hosoda, T., Zheng, H., Delucchi, F., Amano, K., Gonzalez, A., Vitale, S., Ojaimi, C., Rizzi, R., Bolli, R., Yutzey, K. E., Rota, M., Kajstura, J., Anversa, P., & Leri, A. (2008). Notch1 regulates the fate of cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(40), 15529-15534.
- Borges, J. P., & Lessa, M. A. (2015). Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq Bras Cardiol*, 105(1), 71-81.
- Borisov, A. B., & Carlson, B. M. (2000). Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *Anatomical Record*, 258(3), 305-318.
-

-
- Borsheim, E., & Bahr, R. (2003). Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. *Sports Med*, 33(14), 1037-1060.
- Bostrom, P., Mann, N., Wu, J., Quintero, P. A., Plovie, E. R., Panakova, D., Gupta, R. K., Xiao, C., MacRae, C. A., Rosenzweig, A., & Spiegelman, B. M. (2010). C/EBPbeta controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell*, 143(7), 1072-1083.
- Bostrom, P. A., Graham, E. L., Georgiadi, A., & Ma, X. (2013). Impact of exercise on muscle and nonmuscle organs. *IUBMB Life*, 65(10), 845-850.
- Bowles, D. K., Farrar, R. P., & Starnes, J. W. (1992). Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol*, 263(3 Pt 2), H804-809.
- Brady, P. S., Brady, L. J., & Ullrey, D. E. (1979). Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J Nutr*, 109(6), 1103-1109.
- British Heart Foundation. (2017). Heart statistics. Consult. 2017, 2017, disponível em <https://www.bhf.org.uk/research/heart-statistics>
- Brown, D. A., Chicco, A. J., Jew, K. N., Johnson, M. S., Lynch, J. M., Watson, P. A., & Moore, R. L. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol*, 569(Pt 3), 913-924.
- Bupha-Intr, T., & Wattanapermpool, J. (2004). Cardioprotective effects of exercise training on myofilament calcium activation in ovariectomized rats. *J Appl Physiol* (1985), 96(5), 1755-1760.
- Butterfield, J. A., Faddy, S. C., Davidson, P., & Ridge, B. (2008). Exercise training in patients with stable chronic heart failure: effects on thoracic impedance cardiography and B-type natriuretic peptide. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, 28(1), 33-37.
- Buttke, T. M., & Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative Stress as a Mediator of Apoptosis. *Immunology Today*, 15(1), 7-10.
- Calvert, J. W., Condit, M. E., Aragon, J. P., Nicholson, C. K., Moody, B. F., Hood, R. L., Sindler, A. L., Gundewar, S., Seals, D. R., Barouch, L. A., & Lefer, D. J. (2011). Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res*, 108(12), 1448-1458.
- Carraro, U., & Franceschi, C. (1997). Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging (Milano)*, 9(1-2), 19-34.
- Carvalho, F. S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A. J., Carvalho, R. A., & Oliveira, P. J. (2014). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev*, 34(1), 106-135.
- Carvalho, M., Milhazes, N., Remiao, F., Borges, F., Fernandes, E., Amado, F., Monks, T. J., Carvalho, F., & Bastos, M. L. (2004). Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxymphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch Toxicol*, 78(1), 16-24.
- Carvalho, M., Remiao, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho, F., & Bastos, M. L. (2004). The toxicity of N-methyl-alpha-methyldopamine to

-
- freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology*, 200(2-3), 193-203.
- Caulfield, J. B., & Bittner, V. (1988). Cardiac matrix alterations induced by adriamycin. *Am J Pathol*, 133(2), 298-305.
- Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*, 58(3), 319-379.
- Celermajer, D. S., Chow, C. K., Marijon, E., Anstey, N. M., & Woo, K. S. (2012). Cardiovascular disease in the developing world: prevalences, patterns, and the potential of early disease detection. *J Am Coll Cardiol*, 60(14), 1207-1216.
- Cesari, F., Sofi, F., Gori, A. M., Corsani, I., Capalbo, A., Caporale, R., Abbate, R., Gensini, G. F., & Casini, A. (2012). Physical activity and circulating endothelial progenitor cells: an intervention study. *Eur J Clin Invest*, 42(9), 927-932.
- Chatterjee, P. K., Cuzzocrea, S., Brown, P. A., Zacharowski, K., Stewart, K. N., Mota-Filipe, H., & Thiernemann, C. (2000). Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int*, 58(2), 658-673.
- Chen, C. M., Wang, L. F., Su, B., & Hsu, H. H. (2003). Methylprednisolone effects on oxygenation and histology in a rat model of acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther*, 16(4), 215-220.
- Chicco, A. J., Johnson, M. S., Armstrong, C. J., Lynch, J. M., Gardner, R. T., Fasen, G. S., Gillenwater, C. P., & Moore, R. L. (2007). Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(5), H2432-2437.
- Chien, K. R. (2004). Stem cells: lost in translation. *Nature*, 428(6983), 607-608.
- Ciolac, E. G., & Greve, J. M. (2011). Exercise-induced improvements in cardiorespiratory fitness and heart rate response to exercise are impaired in overweight/obese postmenopausal women. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(4), 583-589.
- Corder, G. W., & Foreman, D. I. (2009). *Nonparametric statistics for non-statisticians : a step-by-step approach*. Hoboken, N.J.: Wiley.
- Czubryt, M. P. (2012). Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5(1), 19.
- Dapson, R. W., Fagan, C., Kiernan, J. A., & Wickersham, T. W. (2011). Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80). *Biotech Histochem*, 86(3), 133-139.
- Dawn, B., & Bolli, R. (2005). Cardiac progenitor cells: the revolution continues. *Circ Res*, 97(11), 1080-1082.
- Dawson, E., George, K., Shave, R., Whyte, G., & Ball, D. (2003). Does the human heart fatigue subsequent to prolonged exercise? *Sports Medicine*, 33(5), 365-380.
- Demirel, H. A., Powers, S. K., Caillaud, C., Coombes, J. S., Naito, H., Fletcher, L. A., Vrabas, I., Jessup, J. V., & Ji, L. L. (1998). Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc*, 30(8), 1211-1216.
-

-
- Demirel, H. A., Powers, S. K., Zergeroglu, M. A., Shanely, R. A., Hamilton, K., Coombes, J., & Naito, H. (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* (1985), 91(5), 2205-2212.
- DGS. (2016). Dia Mundial do Coração - 29 de setembro. *Melhor informação, mais saúde* Consult. 10/10/2016, disponível em <http://www.dgs.pt/em-destaque/dia-do-coracao-29-de-setembro.aspx>
- Dickson, E. W., Hogrefe, C. P., Ludwig, P. S., Ackermann, L. W., Stoll, L. L., & Denning, G. M. (2008). Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(1), H402-408.
- Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E., & Tappel, A. L. (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 45(6), 927-932.
- Dinis-Oliveira, R. J., Remiao, F., Duarte, J. A., Ferreira, R., Sanchez Navarro, A., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity. *Free Radic Biol Med*, 41(8), 1213-1224.
- Dirks, A., & Leeuwenburgh, C. (2002). Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(2), R519-527.
- Dos Santos, P., Kowaltowski, A. J., Laclau, M. N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J. B., Tariosse, L., & Garlid, K. D. (2002). Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(1), H284-H295.
- Douglas, P. S., O'Toole, M. L., Hiller, W. D., Hackney, K., & Reichek, N. (1987). Cardiac fatigue after prolonged exercise. *Circulation*, 76(6), 1206-1213.
- Douglas, P. S., O'Toole, M. L., Hiller, W. D., & Reichek, N. (1990). Different effects of prolonged exercise on the right and left ventricles. *J Am Coll Cardiol*, 15(1), 64-69.
- Douglas, P. S., O'Toole, M. L., & Woolard, J. (1990). Regional wall motion abnormalities after prolonged exercise in the normal left ventricle. *Circulation*, 82(6), 2108-2114.
- Downey, J. M. (1990). Free-Radicals and Their Involvement during Long-Term Myocardial-Ischemia and Reperfusion. *Annual Review of Physiology*, 52, 487-504.
- Duarte, J. A., Leao, A., Magalhaes, J., Ascensao, A., Bastos, M. L., Amado, F. L., Vilarinho, L., Quelhas, D., Appell, H. J., & Carvalho, F. (2005). Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle damage in mice. *Toxicology*, 206(3), 349-358.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, 7, 663-698.
- Ellison, G. M., Vicinanza, C., Smith, A. J., Aquila, I., Leone, A., Waring, C. D., Henning, B. J., Stirparo, G. G., Papait, R., Scarfo, M., Agosti, V., Viglietto, G., Condorelli, G., Indolfi, C., Ottolenghi, S., Torella, D., & Nadal-Ginard, B. (2013). Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*, 154(4), 827-842.
-

-
- Ellison, G. M., Waring, C. D., Vicinanza, C., & Torella, D. (2012). Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*, 98(1), 5-10.
- Enoch, S., & Leaper, D. J. (2005). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 23(2), 37-42.
- Esposito, F., Ronchi, R., Milano, G., Margonato, V., Di Tullio, S., Marini, M., Veicsteinas, A., & Samaja, M. (2011). Myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury, training intensity and cessation. *Eur J Appl Physiol*, 111(5), 859-868.
- Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayraud, S., Geny, B., Obert, P., Cazorla, O., Tanguy, S., & Reboul, C. (2013). Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Research in Cardiology*, 108(6).
- Ferdinandy, P., Schulz, R., & Baxter, G. F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*, 59(4), 418-458.
- Feuerstein, G., Ruffolo, R. R., Jr., & Yue, T. L. (1997). Apoptosis and congestive heart failure. *Trends Cardiovasc Med*, 7(7), 249-255.
- Figueiredo, P. A., Appell Coriolano, H. J., & Duarte, J. A. (2014). Cardiac regeneration and cellular therapy: is there a benefit of exercise? *Int J Sports Med*, 35(3), 181-190.
- Fletcher, G. F., Balady, G. J., Amsterdam, E. A., Chaitman, B., Eckel, R., Fleg, J., Froelicher, V. F., Leon, A. S., Pina, I. L., Rodney, R., Simons-Morton, D. A., Williams, M. A., & Bazzarre, T. (2001). Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 104(14), 1694-1740.
- Ford, E. S., & Caspersen, C. J. (2012). Sedentary behaviour and cardiovascular disease: a review of prospective studies. *Int J Epidemiol*, 41(5), 1338-1353.
- Fortescue, E. B., Shin, A. Y., Greenes, D. S., Mannix, R. C., Agarwal, S., Feldman, B. J., Shah, M. I., Rifai, N., Landzberg, M. J., Newburger, J. W., & Almond, C. S. D. (2007). Cardiac troponin increases among runners in the Boston Marathon. *Annals of Emergency Medicine*, 49(2), 137-143.
- Franzen, E., Mangold, S., Erz, G., Claussen, C. D., Niess, A. M., Kramer, U., & Burgstahler, C. (2013). Comparison of morphological and functional adaptations of the heart in highly trained triathletes and long-distance runners using cardiac magnetic resonance imaging. *Heart and Vessels*, 28(5), 626-631.
- Fraser, J. K., Schreiber, R. E., Zuk, P. A., & Hedrick, M. H. (2004). Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4), 658-666.
- Frasier, C. R., Moore, R. L., & Brown, D. A. (2011). Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *J Appl Physiol* (1985), 111(3), 905-915.
- Frasier, C. R., Moukdar, F., Patel, H. D., Sloan, R. C., Stewart, L. M., Alleman, R. J., La Favor, J. D., & Brown, D. A. (2013). Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc Res*, 98(1), 47-55.

-
- Frasier, C. R., Sloan, R. C., Bostian, P. A., Gonzon, M. D., Kurowicki, J., Lopresto, S. J., Anderson, E. J., & Brown, D. A. (2011). Short-term exercise preserves myocardial glutathione and decreases arrhythmias after thiol oxidation and ischemia in isolated rat hearts. *J Appl Physiol* (1985), 111(6), 1751-1759.
- Freimann, S., Scheinowitz, M., Yekutieli, D., Feinberg, M. S., Eldar, M., & Kessler-Icekson, G. (2005). Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression. *J Am Coll Cardiol*, 45(6), 931-938.
- French, J. P., Hamilton, K. L., Quindry, J. C., Lee, Y., Upchurch, P. A., & Powers, S. K. (2008). Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB Journal*, 22(8), 2862-2871.
- Galetta, F., Carpi, A., Abraham, N., Guidotti, E., Russo, M. A., Camici, M., Antonelli, A., Franzoni, F., & Santoro, G. (2012). Age related cardiovascular dysfunction and effects of physical activity. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 2617-2637.
- Galvao, T. F. G., Matos, K. C., Brum, P. C., Negrao, C. E., da Luz, P. L., & Chagas, A. C. P. (2011). Cardioprotection conferred by exercise training is blunted by blockade of the opioid system. *Clinics*, 66(1), 151-157.
- George, K., Whyte, G., Stephenson, C., Shave, R., Dawson, E., Edwards, B., Gaze, D., & Collinson, P. (2004). Postexercise left ventricular function and cTnT in recreational marathon runners. *Med Sci Sports Exerc*, 36(10), 1709-1715.
- Glass, D. J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 1974-1984.
- Goichberg, P., Bai, Y., D'Amario, D., Ferreira-Martins, J., Fiorini, C., Zheng, H., Signore, S., del Monte, F., Ottolenghi, S., D'Alessandro, D. A., Michler, R. E., Hosoda, T., Anversa, P., Kajstura, J., Rota, M., & Leri, A. (2011). The ephrin A1-EphA2 system promotes cardiac stem cell migration after infarction. *Circ Res*, 108(9), 1071-1083.
- Golbidi, S., & Laher, I. (2011). Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. *Cardiol Res Pract*, 2011, 972807.
- Golbidi, S., & Laher, I. (2012). Exercise and the cardiovascular system. *Cardiol Res Pract*, 2012, 210852.
- Gonzalez, A., Rota, M., Nurzynska, D., Misao, Y., Tillmanns, J., Ojaimi, C., Padin-Iruegas, M. E., Muller, P., Esposito, G., Bearzi, C., Vitale, S., Dawn, B., Sanganalmath, S. K., Baker, M., Hintze, T. H., Bolli, R., Urbanek, K., Hosoda, T., Anversa, P., Kajstura, J., & Leri, A. (2008). Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circ Res*, 102(5), 597-606.
- Gorman, A. M., McGowan, A., O'Neill, C., & Cotter, T. (1996). Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J Neurol Sci*, 139 Suppl, 45-52.
- Goto, C., Higashi, Y., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Nakagawa, K., Kawamura, M., Chayama, K., Yoshizumi, M., & Nara, I. (2003). Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*, 108(5), 530-535.
-

-
- Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., & Engler, R. L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 94(4), 1621-1628.
- Green, D. J., O'Driscoll, G., Joyner, M. J., & Cable, N. T. (2008). Exercise and cardiovascular risk reduction: time to update the rationale for exercise? *J Appl Physiol* (1985), 105(2), 766-768.
- Green, D. J., Spence, A., Rowley, N., Thijssen, D. H., & Naylor, L. H. (2012). Vascular adaptation in athletes: is there an 'athlete's artery'? *Exp Physiol*, 97(3), 295-304.
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312.
- Guo, Y., Ledesma, R. A., Peng, R., Liu, Q., & Xu, D. (2016). The Beneficial Effects of Cardiac Rehabilitation on the Function and Levels of Endothelial Progenitor Cells. *Heart Lung Circ*.
- Haizlip, K. M., Bupha-Intr, T., Biesiadecki, B. J., & Janssen, P. M. (2012). Effects of increased preload on the force-frequency response and contractile kinetics in early stages of cardiac muscle hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(12), H2509-2517.
- Hajnal, A., Nagy, O., Litvai, A., Papp, J., Parratt, J. R., & Vegh, A. (2005). Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs. *Life Sci*, 77(16), 1960-1971.
- Hakim, A. A., Petrovitch, H., Burchfiel, C. M., Ross, G. W., Rodriguez, B. L., White, L. R., Yano, K., Curb, J. D., & Abbott, R. D. (1998). Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. *New England Journal of Medicine*, 338(2), 94-99.
- Hambrecht, R., Fiehn, E., Weigl, C., Gielen, S., Hamann, C., Kaiser, R., Yu, J., Adams, V., Niebauer, J., & Schuler, G. (1998). Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 98(24), 2709-2715.
- Hambrecht, R., Wolf, A., Gielen, S., Linke, A., Hofer, J., Erbs, S., Schoene, N., & Schuler, G. (2000). Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 342(7), 454-460.
- Hamilton, K. L., Powers, S. K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N., & Mehta, J. L. (2001). Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3), H1346-1352.
- Hamilton, K. L., Quindry, J. C., French, J. P., Staib, J., Hughes, J., Mehta, J. L., & Powers, S. K. (2004). MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med*, 37(9), 1360-1368.
- Hamilton, K. L., Staib, J. L., Phillips, T., Hess, A., Lennon, S. L., & Powers, S. K. (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: Protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(7), 800-809.
- Harris, M. B., & Starnes, J. W. (2001). Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(5), H2271-2280.
- Hart, E., Dawson, E., Rasmussen, P., George, K., Secher, N. H., Whyte, G., & Shave, R. (2006). beta-Adrenergic receptor desensitization in man: insight

-
- into post-exercise attenuation of cardiac function. *Journal of Physiology-London*, 577(2), 717-725.
- Harvey, P. A., & Leinwand, L. A. (2011). The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*, 194(3), 355-365.
- Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J., & Zierath, J. R. (2014). Integrative biology of exercise. *Cell*, 159(4), 738-749.
- Haykowsky, M., Welsh, R., Humen, D., Warburton, D., & Taylor, D. (2001). Impaired left ventricular systolic function after a half-ironman race. *Can J Cardiol*, 17(6), 687-690.
- Healy, G. N., Matthews, C. E., Dunstan, D. W., Winkler, E. A., & Owen, N. (2011). Sedentary time and cardio-metabolic biomarkers in US adults: NHANES 2003-06. *Eur Heart J*, 32(5), 590-597.
- Heinonen, I., Kalliokoski, K. K., Hannukainen, J. C., Duncker, D. J., Nuutila, P., & Knuuti, J. (2014). Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans. *Physiology (Bethesda)*, 29(6), 421-436.
- Hoover-Plow, J., & Gong, Y. (2012). Challenges for heart disease stem cell therapy. *Vasc Health Risk Manag*, 8, 99-113.
- Hornig, B., Maier, V., & Drexler, H. (1996). Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 93(2), 210-214.
- Hosoda, T., D'Amario, D., Cabral-da-Silva, M. C., Zheng, H. Q., Padin-Iruegas, M. E., Ogorek, B., Ferreira-Martins, J., Yasuzawa-Amano, S., Amano, K., Ide-Iwata, N., Cheng, W., Rota, M., Urbanek, K., Kajstura, J., Anversa, P., & Leri, A. (2009). Clonality of mouse and human cardiomyogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), 17169-17174.
- Hotkar, A. J., & Balinsky, W. (2012). Stem cells in the treatment of cardiovascular disease--an overview. *Stem Cell Rev*, 8(2), 494-502.
- Hou, J., Wang, L., Jiang, J., Zhou, C., Guo, T., Zheng, S., & Wang, T. (2013). Cardiac stem cells and their roles in myocardial infarction. *Stem Cell Rev*, 9(3), 326-338.
- Huang, C. C., Lin, T. J., Chen, C. C., & Lin, W. T. (2009). Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. *Eur J Appl Physiol*, 107(6), 697-706.
- Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S., & Livingston, E. H. (2007). Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res*, 139(1), 143-156.
- Hunter, J. J., & Chien, K. R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, 341(17), 1276-1283.
- Januzzi, J. L., Jr., Filippatos, G., Nieminen, M., & Gheorghiade, M. (2012). Troponin elevation in patients with heart failure: on behalf of the third Universal Definition of Myocardial Infarction Global Task Force: Heart Failure Section. *Eur Heart J*, 33(18), 2265-2271.
- Ji, L. L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*, 23, 135-166.
- Ji, L. L., & Leichtweis, S. (1997). Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age (Omaha)*, 20(2), 91-106.
-

-
- Jin, H., Yang, R., Li, W., Lu, H., Ryan, A. M., Ogasawara, A. K., Van Peborgh, J., & Paoni, N. F. (2000). Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(6), H2994-3002.
- Jin, R. C., & Loscalzo, J. (2010). Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. *J Blood Med*, 2010(1), 147-162.
- Junqueira, L. C., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 11(4), 447-455.
- Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., & Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol*, 8(18), 1001-1008.
- Kajstura, J., Cheng, W., Sarangarajan, R., Li, P., Li, B., Nitahara, J. A., Chapnick, S., Reiss, K., Olivetti, G., & Anversa, P. (1996). Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol*, 271(3 Pt 2), H1215-1228.
- Kajstura, J., Gurusamy, N., Ogorek, B., Goichberg, P., Clavo-Rondon, C., Hosoda, T., D'Amario, D., Bardelli, S., Beltrami, A. P., Cesselli, D., Bussani, R., del Monte, F., Quaini, F., Rota, M., Beltrami, C. A., Buchholz, B. A., Leri, A., & Anversa, P. (2010). Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ Res*, 107(11), 1374-1386.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., & Anversa, P. (1998). Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8801-8805.
- Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafe, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., & Anversa, P. (2005). Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*, 96(1), 127-137.
- Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogorek, B., Ferreira-Martins, J., Goichberg, P., Rondon-Clavo, C., Sanada, F., D'Amario, D., Rota, M., Del Monte, F., Orlic, D., Tisdale, J., Leri, A., & Anversa, P. (2010). Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res*, 107(2), 305-315.
- Kang, P. M., Yue, P., Liu, Z., Tarnavski, O., Bodyak, N., & Izumo, S. (2004). Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(1), H72-80.
- Kannel, W. B. (1983). An overview of risk factor for cardiovascular disease. In N. M. S. Kaplan, J. (Ed.), *Prevention of coronary heart disease: practical management of the risk factors*. (pp. 1-19). Washington, DC, : W.B. Saunders.
- Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., & Fujiwara, H. (1999). Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*, 99(21), 2757-2764.
- Kanzaki, Y., Yamauchi, Y., Okabe, M., Terasaki, F., & Ishizaka, N. (2012). Three-dimensional architecture of cardiomyocytes and connective tissues in
-

-
- hypertrophic cardiomyopathy: a scanning electron microscopic observation. *Circulation*, 125(5), 738-739.
- Kavazis, A. N. (2009). Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med*, 39(11), 923-935.
- Kavazis, A. N., Smuder, A. J., & Powers, S. K. (2014). Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 117(3), 223-230.
- Kelly, B. B., Narula, J., & Fuster, V. (2012). Recognizing global burden of cardiovascular disease and related chronic diseases. *Mt Sinai J Med*, 79(6), 632-640.
- Kemi, O. J., Haram, P. M., Loennechen, J. P., Osnes, J. B., Skomedal, T., Wisloff, U., & Ellingsen, O. (2005). Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res*, 67(1), 161-172.
- Kemi, O. J., Haram, P. M., Wisloff, U., & Ellingsen, O. (2004). Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *European Heart Journal*, 25, 226-226.
- Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisloff, U., & Ellingsen, O. (2002). Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*, 93(4), 1301-1309.
- Ketelhut, R., Losem, C. J., & Messerli, F. H. (1994). Is a Decrease in Arterial-Pressure during Long-Term Aerobic Exercise Caused by a Fall in Cardiac Pump Function. *American Heart Journal*, 127(3), 567-571.
- Kim, Y. J., Shin, Y. O., Lee, J. B., Lee, Y. H., Shin, K. A., Kim, A. C., Goh, C. W., Kim, C., Oh, J. K., Min, Y. K., & Yang, H. M. (2014). The effects of running a 308 km ultra-marathon on cardiac markers. *European Journal of Sport Science*, 14, S92-S97.
- Kocher, A. A., Schlechta, B., Gasparovicova, A., Wolner, E., Bonaros, N., & Laufer, G. (2007). Stem cells and cardiac regeneration. *Transpl Int*, 20(9), 731-746.
- Kohl, H. W., 3rd, Craig, C. L., Lambert, E. V., Inoue, S., Alkandari, J. R., Leetongin, G., Kahlmeier, S., & Lancet Physical Activity Series Working, G. (2012). The pandemic of physical inactivity: global action for public health. *Lancet*, 380(9838), 294-305.
- Konstam, M. A. (2000). Progress in heart failure Management? Lessons from the real world. *Circulation*, 102(10), 1076-1078.
- Kueth, F., Richartz, B. M., Kasper, C., Sayer, H. G., Hoeffken, K., Werner, G. S., & Figulla, H. R. (2005). Autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in chronic ischemic cardiomyopathy in humans. *Int J Cardiol*, 100(3), 485-491.
- Kwak, H. B. (2013a). Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *J Exerc Rehabil*, 9(3), 338-347.
- Kwak, H. B. (2013b). Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*, 9(2), 212-219.
-

-
- Kwak, H. B., Song, W., & Lawler, J. M. (2006). Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *Faseb Journal*, 20(2), 791-+.
- La Gerche, A., Connelly, K. A., Mooney, D. J., MacIsaac, A. I., & Prior, D. L. (2008). Biochemical and functional abnormalities of left and right ventricular function after ultra-endurance exercise. *Heart*, 94(7), 860-866.
- LaForgia, J., Withers, R. T., & Gore, C. J. (2006). Effects of exercise intensity and duration on the excess post-exercise oxygen consumption. *J Sports Sci*, 24(12), 1247-1264.
- Lara Fernandes, J., Serrano, C. V., Jr., Toledo, F., Hunziker, M. F., Zamperini, A., Teo, F. H., Oliveira, R. T., Blotta, M. H., Rondon, M. U., & Negrao, C. E. (2011). Acute and chronic effects of exercise on inflammatory markers and B-type natriuretic peptide in patients with coronary artery disease. *Clin Res Cardiol*, 100(1), 77-84.
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K., Miche, E., Bohm, M., & Nickenig, G. (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 109(2), 220-226.
- Laughlin, M. H., & McAllister, R. M. (1992). Exercise training-induced coronary vascular adaptation. *J Appl Physiol* (1985), 73(6), 2209-2225.
- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L. Z., Cai, C. L., Lu, M. M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J. X., Evans, S., & Chien, K. R. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 433(7026), 647-653.
- Lee, I. M., Hsieh, C. C., & Paffenbarger, R. S., Jr. (1995). Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *JAMA*, 273(15), 1179-1184.
- Lee, S. D., Shyu, W. C., Cheng, I. S., Kuo, C. H., Chan, Y. S., Lin, Y. M., Tasi, C. Y., Tsai, C. H., Ho, T. J., & Huang, C. Y. (2013). Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23(6), 566-573.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P. A., Holloszy, J. O., & Heinecke, J. W. (1999). Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med*, 27(1-2), 186-192.
- Legaz-Arrese, A., George, K., Carranza-Garcia, L. E., Munguia-Izquierdo, D., Moros-Garcia, T., & Serrano-Ostariz, E. (2011). The impact of exercise intensity on the release of cardiac biomarkers in marathon runners. *Eur J Appl Physiol*, 111(12), 2961-2967.
- Lennon, S. L., Quindry, J., Hamilton, K. L., French, J., Staib, J., Mehta, J. L., & Powers, S. K. (2004). Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol* (1985), 96(4), 1299-1305.
- Lennon, S. L., Quindry, J. C., Hamilton, K. L., French, J. P., Hughes, J., Mehta, J. L., & Powers, S. K. (2004). Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(2), H975-980.

-
- Leri, A., Kajstura, J., & Anversa, P. (2011). Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res*, 109(8), 941-961.
- Leri, A., Rota, M., Hosoda, T., Goichberg, P., & Anversa, P. (2014). Cardiac stem cell niches. *Stem Cell Res*, 13(3 Pt B), 631-646.
- Leri, A., Rota, M., Pasqualini, F. S., Goichberg, P., & Anversa, P. (2015). Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res*, 116(1), 150-166.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
- Li, L., Takemura, G., Li, Y., Miyata, S., Esaki, M., Okada, H., Kanamori, H., Khai, N. C., Maruyama, R., Ogino, A., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., & Fujiwara, H. (2006). Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*, 113(4), 535-543.
- Li, T., Danelisen, I., & Singal, P. K. (2002). Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem*, 232(1-2), 19-26.
- Libonati, J. R., Kendrick, Z. V., & Houser, S. R. (2005). Sprint training improves postischemic, left ventricular diastolic performance. *J Appl Physiol* (1985), 99(6), 2121-2127.
- Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., Hintze, T. H., Kajstura, J., & Anversa, P. (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25), 8966-8971.
- Loo, D. T. (2011). In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol*, 682, 3-13.
- Manson, J. E., Greenland, P., LaCroix, A. Z., Stefanick, M. L., Mouton, C. P., Oberman, A., Perri, M. G., Sheps, D. S., Pettinger, M. B., & Siscovick, D. S. (2002). Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*, 347(10), 716-725.
- Marini, M., Lapalombella, R., Margonato, V., Ronchi, R., Samaja, M., Scapin, C., Gorza, L., Maraldi, T., Carinci, P., Ventura, C., & Veicsteinas, A. (2007). Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile. *Eur J Appl Physiol*, 99(5), 503-510.
- Maron, B. J., Poliac, L. C., & Roberts, W. O. (1996). Risk for sudden cardiac death associated with marathon running. *J Am Coll Cardiol*, 28(2), 428-431.
- Martin, C. M., Meeson, A. P., Robertson, S. M., Hawke, T. J., Richardson, J. A., Bates, S., Goetsch, S. C., Gallardo, T. D., & Garry, D. J. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol*, 265(1), 262-275.
- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., & Komuro, I. (2004). Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11384-11391.
-

-
- McElroy, C. L., Gissen, S. A., & Fishbein, M. C. (1978). Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*, 57(5), 958-962.
- McMullen, J. R., & Jennings, G. L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(4), 255-262.
- Meinhardt, A., Spicher, A., Roehrich, M. E., Glauche, I., Vogt, P., & Vassalli, G. (2011). Immunohistochemical and flow cytometric analysis of long-term label-retaining cells in the adult heart. *Stem Cells Dev*, 20(2), 211-222.
- Melling, C. W., Thorp, D. B., Milne, K. J., & Noble, E. G. (2009). Myocardial Hsp70 phosphorylation and PKC-mediated cardioprotection following exercise. *Cell Stress Chaperones*, 14(2), 141-150.
- Melov, S., Coskun, P., Patel, M., Tuinstra, R., Cottrell, B., Jun, A. S., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., Goodman, S. I., Huang, T. T., Miziorko, H., Epstein, C. J., & Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3), 846-851.
- Melzer, K., Kayser, B., & Pichard, C. (2004). Physical activity: the health benefits outweigh the risks. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7(6), 641-647.
- Mendes, A. B., Ferro, M., Rodrigues, B., Souza, M. R., Araujo, R. C., & Souza, R. R. (2012). Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly. *Medicina (B Aires)*, 72(3), 216-220.
- Menna, P., Paz, O. G., Chello, M., Covino, E., Salvatorelli, E., & Minotti, G. (2012). Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf*, 11 Suppl 1, S21-36.
- Meschiari, C. A., Ero, O. K., Pan, H., Finkel, T., & Lindsey, M. L. (2017). The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *Geroscience*, 39(1), 7-18.
- Michelsen, M. M., Stottrup, N. B., Schmidt, M. R., Lofgren, B., Jensen, R. V., Tropak, M., St-Michel, E. J., Redington, A. N., & Botker, H. E. (2012). Exercise-induced cardioprotection is mediated by a bloodborne, transferable factor. *Basic Research in Cardiology*, 107(3).
- Middleton, N., Shave, R., George, K., Whyte, G., Hart, E., & Atkinson, G. (2006). Left ventricular function immediately following prolonged exercise: A meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 38(4), 681-687.
- Miller, L. E., Hosick, P. A., Wrieden, J., Hoyt, E., & Quindry, J. C. (2012). Evaluation of arrhythmia scoring systems and exercise-induced cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc*, 44(3), 435-441.
- Mittleman, M. A., Maclure, M., Tofler, G. H., Sherwood, J. B., Goldberg, R. J., & Muller, J. E. (1993). Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J Med*, 329(23), 1677-1683.
- Mohan, C., Long, K., Mutneja, M., & Ma, J. (2015). Detection of end-stage apoptosis by ApopTag(R) TUNEL technique. *Methods Mol Biol*, 1219, 43-56.

-
- Moran, M., Blazquez, I., Saborido, A., & Megias, A. (2005). Antioxidants and ecto-5'-nucleotidase are not involved in the training-induced cardioprotection against ischaemia-reperfusion injury. *Exp Physiol*, 90(4), 507-517.
- Moreo, A., Ambrosio, G., De Chiara, B., Pu, M., Tran, T., Mauri, F., & Raman, S. V. (2009). Influence of myocardial fibrosis on left ventricular diastolic function: noninvasive assessment by cardiac magnetic resonance and echo. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2(6), 437-443.
- Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B., & Marban, E. (2001). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 89(10), 891-898.
- Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., & Anversa, P. (2003). Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*, 92(2), 139-150.
- Nadal-Ginard, B., & Mahdavi, V. (1989). Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *The Journal of clinical investigation*, 84(6), 1693-1700.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765), 98-103.
- Neilan, T. G., Januzzi, J. L., Lee-Lewandrowski, E., Ton-Nu, T. T., Yoerger, D. M., Jassal, D. S., Lewandrowski, K. B., Siegel, A. J., Marshall, J. E., Douglas, P. S., Lawlor, D., Picard, M. H., & Wood, M. J. (2006). Myocardial injury and ventricular dysfunction related to training levels among nonelite participants in the Boston marathon. *Circulation*, 114(22), 2325-2333.
- Nicholson, C. K., Lambert, J. P., Chow, C. W., Lefer, D. J., & Calvert, J. W. (2013). Chronic exercise downregulates myocardial myoglobin and attenuates nitrite reductase capacity during ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 64, 1-10.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Smith, L. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Davis, J. M., Kaminsky, D. E., & Shute, M. (2001). Cytokine changes after a marathon race. *J Appl Physiol* (1985), 91(1), 109-114.
- Niemela, K. O., Palatsi, I. J., Ikaheimo, M. J., Takkunen, J. T., & Vuori, J. J. (1984). Evidence of impaired left ventricular performance after an uninterrupted competitive 24 hour run. *Circulation*, 70(3), 350-356.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, 305(5930), 147-148.
- Novelli, G. P., Bracciotti, G., & Falsini, S. (1990). Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med*, 8(1), 9-13.
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., Entman, M. L., & Schneider, M. D. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21), 12313-12318.
- Oliveira, P. J., Bjork, J. A., Santos, M. S., Leino, R. L., Froberg, M. K., Moreno, A. J., & Wallace, K. B. (2004). Carvedilol-mediated antioxidant protection

-
- against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 200(2), 159-168.
- Olivetti, G., Giordano, G., Corradi, D., Melissari, M., Lagrasta, C., Gambert, S. R., & Anversa, P. (1995). Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*, 26(4), 1068-1079.
- Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., & Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res*, 68(6), 1560-1568.
- Omland, T., Pfeffer, M. A., Solomon, S. D., de Lemos, J. A., Rosjo, H., Saltyte Benth, J., Maggioni, A., Domanski, M. J., Rouleau, J. L., Sabatine, M. S., Braunwald, E., & Investigators, P. (2013). Prognostic value of cardiac troponin I measured with a highly sensitive assay in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 61(12), 1240-1249.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D. M., Leri, A., & Anversa, P. (2003). Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant*, 7 Suppl 3, 86-88.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., & Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410(6829), 701-705.
- Owen, N., Healy, G. N., Matthews, C. E., & Dunstan, D. W. (2010). Too much sitting: the population health science of sedentary behavior. *Exerc Sport Sci Rev*, 38(3), 105-113.
- Pedersen, B. K., Rohde, T., & Ostrowski, K. (1998). Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand*, 162(3), 325-332.
- Penedo, F. J., & Dahn, J. R. (2005). Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. *Curr Opin Psychiatry*, 18(2), 189-193.
- Pereira, G. C., Silva, A. M., Diogo, C. V., Carvalho, F. S., Monteiro, P., & Oliveira, P. J. (2011). Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. *Curr Pharm Des*, 17(20), 2113-2129.
- Peterson, J. M., Bryner, R. W., Sindler, A., Frisbee, J. C., & Alway, S. E. (2008). Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985), 105(6), 1934-1943.
- Phaneuf, S., & Leeuwenburgh, C. (2001). Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 33(3), 393-396.
- Pistilli, E. E., Jackson, J. R., & Alway, S. E. (2006). Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle. *Apoptosis*, 11(12), 2115-2126.
- Podhorska-Okolow, M., Krajewska, B., Carraro, U., & Zabel, M. (1999). Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol*, 37(2), 127-128.
- Podhorska-Okolow, M., Sandri, M., Zampieri, S., Brun, B., Rossini, K., & Carraro, U. (1998). Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24(6), 518-531.

-
- Pollack, M., & Leeuwenburgh, C. (2001). Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56(11), B475-482.
- Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A., & Leeuwenburgh, C. (2002). The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 93-107.
- Poole, T. (1997). Happy animals make good science. *Lab Anim*, 31(2), 116-124.
- Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L. L., Martin, D., Herb, R. A., & Dudley, G. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266(2 Pt 2), R375-380.
- Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Martin, D., Lieu, F. K., Ji, L. L., & Herb, R. A. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol*, 265(6 Pt 2), H2094-2098.
- Powers, S. K., Demirel, H. A., Vincent, H. K., Coombes, J. S., Naito, H., Hamilton, K. L., Shanely, R. A., & Jessup, J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*, 275(5 Pt 2), R1468-1477.
- Powers, S. K., & Howley, E. T. (2009). *Exercise physiology theory and application to fitness and performance* (Seventh edition ed.). New York: McGraw-Hill.
- Powers, S. K., Ji, L. L., & Leeuwenburgh, C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, 31(7), 987-997.
- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & DeRuisseau, K. C. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(2), R337-344.
- Powers, S. K., Lennon, S. L., Quindry, J., & Mehta, J. L. (2002). Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol*, 17(5), 495-502.
- Powers, S. K., Locke, & Demirel, H. A. (2001). Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc*, 33(3), 386-392.
- Powers, S. K., Murlasits, Z., Wu, M., & Kavazis, A. N. (2007). Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, 39(9), 1529-1536.
- Powers, S. K., Quindry, J. C., & Kavazis, A. N. (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, 44(2), 193-201.
- Powers, S. K., Smuder, A. J., Kavazis, A. N., & Quindry, J. C. (2014). Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda)*, 29(1), 27-38.
- Powers, S. K., Sollanek, K. J., Wiggs, M. P., Demirel, H. A., & Smuder, A. J. (2014). Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: the antioxidant players and cardioprotection. *Free radical research*, 48(1), 43-51.
- Primeau, A. J., Adhihetty, P. J., & Hood, D. A. (2002). Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*, 27(4), 349-395.
- Puchtler, H., Sweat, F., & Kuhns, J. G. (1964). On the Binding of Direct Cotton Dyes by Amyloid. *J Histochem Cytochem*, 12, 900-907.
-

-
- Pynn, M., Schafer, K., Konstantinides, S., & Halle, M. (2004). Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*, 109(3), 386-392.
- Quaini, F., Cigola, E., Lagrasta, C., Saccani, G., Quaini, E., Rossi, C., Olivetti, G., & Anversa, P. (1994). End-Stage Cardiac-Failure in Humans Is Coupled with the Induction of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Nuclear Mitotic Division in Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 75(6), 1050-1063.
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., & Anversa, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 346(1), 5-15.
- Quindry, J. C., & Hamilton, K. L. (2013). Exercise and cardiac preconditioning against ischemia reperfusion injury. *Curr Cardiol Rev*, 9(3), 220-229.
- Quindry, J. C., Hamilton, K. L., French, J. P., Lee, Y., Murlasits, Z., Tumer, N., & Powers, S. K. (2007). Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis. *J Appl Physiol* (1985), 103(3), 1056-1062.
- Quindry, J. C., Miller, L., McGinnis, G., Kliszczewicz, B., Irwin, J. M., Landram, M., Urbiztondo, Z., Nanayakkara, G., & Amin, R. (2012). Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *J Appl Physiol* (1985), 113(3), 498-506.
- Quindry, J. C., Schreiber, L., Hosick, P., Wrieden, J., Irwin, J. M., & Hoyt, E. (2010). Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(1), H175-183.
- Raj, S., Franco, V. I., & Lipshultz, S. E. (2014). Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 16(6), 315.
- Rognmo, O., Hetland, E., Helgerud, J., Hoff, J., & Slordahl, S. A. (2004). High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 11(3), 216-222.
- Roque, F. R., Soci, U. P., De Angelis, K., Coelho, M. A., Furstenau, C. R., Vassallo, D. V., Irigoyen, M. C., & Oliveira, E. M. (2011). Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(12), 2105-2111.
- Rubin, E., & Farber, J. L. (1994). Cell injury. In *Pathology* (2nd ed., pp. 15-25). Philadelphia: Lippincott.
- Saeki, K., Obi, I., Ogiku, N., Shigekawa, M., Imagawa, T., & Matsumoto, T. (2002). Doxorubicin directly binds to the cardiac-type ryanodine receptor. *Life Sci*, 70(20), 2377-2389.
- Sanada, F., Kim, J., Czarna, A., Chan, N. Y., Signore, S., Ogorek, B., Isobe, K., Wybieralska, E., Borghetti, G., Pesapane, A., Sorrentino, A., Mangano, E., Cappetta, D., Mangiaracina, C., Ricciardi, M., Cimini, M., Ifedigbo, E., Perrella, M. A., Goichberg, P., Choi, A. M., Kajstura, J., Hosoda, T., Rota, M., Anversa, P., & Leri, A. (2014). c-Kit-positive cardiac stem cells nested

-
- in hypoxic niches are activated by stem cell factor reversing the aging myopathy. *Circ Res*, 114(1), 41-55.
- Sandri, M., Carraro, U., Podhorska-Okolow, M., Rizzi, C., Arslan, P., Monti, D., & Franceschi, C. (1995). Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett*, 373(3), 291-295.
- Sandri, M., El Meslemani, A. H., Sandri, C., Schjerling, P., Vissing, K., Andersen, J. L., Rossini, K., Carraro, U., & Angelini, C. (2001). Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment? *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(3), 302-312.
- Sandri, M., Minetti, C., Pedemonte, M., & Carraro, U. (1998). Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Laboratory Investigation*, 78(8), 1005-1016.
- Sandri, M., Podhorska-Okolow, M., Geromel, V., Rizzi, C., Arslan, P., Franceschi, C., & Carraro, U. (1997). Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(1), 45-57.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., & Vina, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49(5), 427-435.
- Scharhag, J., Herrmann, M., Urhausen, A., Haschke, M., Herrmann, W., & Kindermann, W. (2005). Independent elevations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiac troponins in endurance athletes after prolonged strenuous exercise. *Am Heart J*, 150(6), 1128-1134.
- Schnohr, P., O'Keefe, J. H., Marott, J. L., Lange, P., & Jensen, G. B. (2015). Dose of jogging and long-term mortality: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol*, 65(5), 411-419.
- Schultz, J. E., & Gross, G. J. (2001). Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther*, 89(2), 123-137.
- Schultz, J. E., Rose, E., Yao, Z., & Gross, G. J. (1995). Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*, 268(5 Pt 2), H2157-2161.
- Scott, J. M., Esch, B. T., Shave, R., Warburton, D. E., Gaze, D., & George, K. (2009). Cardiovascular consequences of completing a 160-km ultramarathon. *Med Sci Sports Exerc*, 41(1), 26-34.
- Segers, V. F., & Lee, R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*, 451(7181), 937-942.
- Sen, C. K. (2001). Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med*, 31(13), 891-908.
- Sene-Fiorese, M., Duarte, F. O., Scarmagnani, F. R., Cheik, N. C., Manzoni, M. S., Nonaka, K. O., Rossi, E. A., de Oliveira Duarte, A. C., & Damaso, A. R. (2008). Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*, 16(10), 2217-2222.
- Senyo, S. E., Steinhauser, M. L., Pizzimenti, C. L., Yang, V. K., Cai, L., Wang, M., Wu, T. D., Guerin-Kern, J. L., Lechene, C. P., & Lee, R. T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 493(7432), 433-436.
-

-
- Sharov, V. G., Sabbah, H. N., Shimoyama, H., Goussev, A. V., Lesch, M., & Goldstein, S. (1996). Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*, 148(1), 141-149.
- Sharpe, N. (2004). Cardiac remodeling in coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 93(9A), 17B-20B.
- Shave, R., Dawson, E., Whyte, G., George, K., Gaze, D., & Collinson, P. (2004). Altered cardiac function and minimal cardiac damage during: Prolonged exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(7), 1098-1103.
- Shephard, R. J., & Balady, G. J. (1999). Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*, 99(7), 963-972.
- Shindoh, C., DiMarco, A., Thomas, A., Manubay, P., & Supinski, G. (1990). Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J Appl Physiol* (1985), 68(5), 2107-2113.
- Siasos, G., Athanasiou, D., Terzis, G., Stasinaki, A., Oikonomou, E., Tsitkanou, S., Kolokytha, T., Spengos, K., Papavassiliou, A. G., & Tousoulis, D. (2016). Acute effects of different types of aerobic exercise on endothelial function and arterial stiffness. *Eur J Prev Cardiol*.
- Siegel, A. J., Stec, J. J., Lipinska, I., Van Cott, E. M., Lewandrowski, K. B., Ridker, P. M., & Tofler, G. H. (2001). Effect of marathon running on inflammatory and hemostatic markers. *Am J Cardiol*, 88(8), 918-920, A919.
- Simunek, T., Sterba, M., Popelova, O., Adamcova, M., Hrdina, R., & Gersl, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*, 61(1), 154-171.
- Singal, P. K., & Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 339(13), 900-905.
- Siscovick, D. S., Weiss, N. S., Fletcher, R. H., & Lasky, T. (1984). The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. *N Engl J Med*, 311(14), 874-877.
- Siu, P. M., Bryner, R. W., Martyn, J. K., & Alway, S. E. (2004). Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J*, 18(10), 1150-1152.
- Smart, N., Bollini, S., Dube, K. N., Vieira, J. M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A. N., Lythgoe, M. F., Pu, W. T., & Riley, P. R. (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature*, 474(7353), 640-644.
- Sofi, F., Capalbo, A., Cesari, F., Abbate, R., & Gensini, G. F. (2008). Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15(3), 247-257.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267(5203), 1445-1449.
- Stewart, K. J. (2002). Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA*, 288(13), 1622-1631.
- Stewart, K. J., Ouyang, P., Bacher, A. C., Lima, S., & Shapiro, E. P. (2006). Exercise effects on cardiac size and left ventricular diastolic function:

-
- relationships to changes in fitness, fatness, blood pressure and insulin resistance. *Heart*, 92(7), 893-898.
- Stone, J. A., Cyr, C., Friesen, M., Kennedy-Symonds, H., Stene, R., Smilovitch, M., & Canadian Association of Cardiac, R. (2001). Canadian guidelines for cardiac rehabilitation and atherosclerotic heart disease prevention: a summary. *Can J Cardiol*, 17 Suppl B, 3B-30B.
- Strom, C. C., Aplin, M., Ploug, T., Christoffersen, T. E., Langfort, J., Viese, M., Galbo, H., Haunso, S., & Sheikh, S. P. (2005). Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy. *FEBS J*, 272(11), 2684-2695.
- Sun, Y., & Weber, K. T. (2000). Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res*, 46(2), 250-256.
- Susman, E. J., Reiter, E. O., Ford, C., & Dorn, L. D. (2002). Work group I: developing models of healthy adolescent physical development. *J Adolesc Health*, 31(6 Suppl), 171-174.
- Suzuki, H., Poole, D. C., Zweifach, B. W., & SchmidSchonbein, G. W. (1995). Temporal correlation between maximum tetanic force and cell death in postischemic rat skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 2892-2897.
- Suzuki, K., Totsuka, M., Nakaji, S., Yamada, M., Kudoh, S., Liu, Q., Sugawara, K., Yamaya, K., & Sato, K. (1999). Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *Journal of Applied Physiology*, 87(4), 1360-1367.
- Takemura, G., & Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*, 49(5), 330-352.
- Tehrani, D. M., & Seto, A. H. (2013). Third universal definition of myocardial infarction: update, caveats, differential diagnoses. *Cleve Clin J Med*, 80(12), 777-786.
- Thijssen, D. H., Torella, D., Hopman, M. T., & Ellison, G. M. (2009). The role of endothelial progenitor and cardiac stem cells in the cardiovascular adaptations to age and exercise. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 4685-4702.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203), 1456-1462.
- Thoren, P., Floras, J. S., Hoffmann, P., & Seals, D. R. (1990). Endorphins and exercise: physiological mechanisms and clinical implications. *Med Sci Sports Exerc*, 22(4), 417-428.
- Tiyyagura, S. R., & Pinney, S. P. (2006). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt Sinai J Med*, 73(6), 840-851.
- Torella, D., Ellison, G. M., Karakikes, I., & Nadal-Ginard, B. (2007). Resident cardiac stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 64(6), 661-673.
- Towbin, J. A., & Bowles, N. E. (2002). The failing heart. *Nature*, 415(6868), 227-233.
- Tschentscher, M., Eichinger, J., Egger, A., Droese, S., Schonfelder, M., & Niebauer, J. (2016). High-intensity interval training is not superior to other

-
- forms of endurance training during cardiac rehabilitation. *Eur J Prev Cardiol*, 23(1), 14-20.
- Urbanek, K., Cabral-da-Silva, M. C., Ide-Iwata, N., Maestroni, S., Delucchi, F., Zheng, H., Ferreira-Martins, J., Ogorek, B., D'Amario, D., Bauer, M., Zerbini, G., Rota, M., Hosoda, T., Liao, R., Anversa, P., Kajstura, J., & Leri, A. (2010). Inhibition of notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart. *Circ Res*, 107(3), 429-441.
- Urbanek, K., Cesselli, D., Rota, M., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Bearzi, C., Boni, A., Bolli, R., Kajstura, J., Anversa, P., & Leri, A. (2006). Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9226-9231.
- Urbanek, K., Quaini, F., Tasca, G., Torella, D., Castaldo, C., Nadal-Ginard, B., Leri, A., Kajstura, J., Quaini, E., & Anversa, P. (2003). Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10440-10445.
- Urbanek, K., Rota, M., Cascapera, S., Bearzi, C., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Chimenti, S., Baker, M., Limana, F., Nurzynska, D., Torella, D., Rotatori, F., Rastaldo, R., Musso, E., Quaini, F., Leri, A., Kajstura, J., & Anversa, P. (2005). Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res*, 97(7), 663-673.
- Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C. A., Bussani, R., Beltrami, A. P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J., & Anversa, P. (2005). Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(24), 8692-8697.
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., & Lorenzon, G. (1994). A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol*, 10(5-6), 415-421.
- Vander Heide, R. S., Hill, M. L., Reimer, K. A., & Jennings, R. B. (1996). Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: relationship to ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 28(1), 103-112.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D. V., Festjens, N., & Vandenabeele, P. (2008). Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med*, 8(3), 207-220.
- Vanoverschelde, J. L., Younis, L. T., Melin, J. A., Vanbutsele, R., Leclercq, B., Robert, A. R., Cosyns, J. R., & Detry, J. M. (1991). Prolonged exercise induces left ventricular dysfunction in healthy subjects. *J Appl Physiol* (1985), 70(3), 1356-1363.
- Volaklis, K. A., Tokmakidis, S. P., & Halle, M. (2013). Acute and chronic effects of exercise on circulating endothelial progenitor cells in healthy and diseased patients. *Clin Res Cardiol*, 102(4), 249-257.
- Vukusic, K., Asp, J., Henriksson, H. B., Brisby, H., Lindahl, A., & Sandstedt, J. (2015). Physical exercise affects slow cycling cells in the rat heart and
-

-
- reveals a new potential niche area in the atrioventricular junction. *J Mol Histol*.
- Warburton, D. E., Nicol, C. W., & Bredin, S. S. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, 174(6), 801-809.
- Waring, C. D., Henning, B. J., Smith, A. J., Nadal-Ginard, B., Torella, D., & Ellison, G. M. (2015). Cardiac adaptations from 4 weeks of intensity-controlled vigorous exercise are lost after a similar period of detraining. *Physiol Rep*, 3(2).
- Waring, C. D., Vicinanza, C., Papalamprou, A., Smith, A. J., Purushothaman, S., Goldspink, D. F., Nadal-Ginard, B., Torella, D., & Ellison, G. M. (2014). The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *Eur Heart J*, 35(39), 2722-2731.
- Wasserman, K., Whipp, B. J., Kooyl, S. N., & Beaver, W. L. (1973). Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*, 35(2), 236-243.
- Weber, K. T., Sun, Y., & Katwa, L. C. (1996). Wound healing following myocardial infarction. *Clin Cardiol*, 19(6), 447-455.
- Weeks, K. L., & McMullen, J. R. (2011). The Athlete's Heart vs. the Failing Heart: Can Signaling Explain the Two Distinct Outcomes? *Physiology*, 26(2), 97-105.
- Werner, C., Hanhoun, M., Widmann, T., Kazakov, A., Semenov, A., Poss, J., Bauersachs, J., Thum, T., Pfreundschuh, M., Muller, P., Haendeler, J., Bohm, M., & Laufs, U. (2008). Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol*, 52(6), 470-482.
- Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., & Kitsis, R. N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*, 72, 19-44.
- White, F. C., Bloor, C. M., McKirnan, M. D., & Carroll, S. M. (1998). Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol* (1985), 85(3), 1160-1168.
- Whyte, G. P., George, K., Sharma, S., Lumley, S., Gates, P., Prasad, K., & McKenna, W. J. (2000). Cardiac fatigue following prolonged endurance exercise of differing distances. *Med Sci Sports Exerc*, 32(6), 1067-1072.
- Wilson, M. G., Ellison, G. M., & Cable, N. T. (2015). Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Heart*, 101(10), 758-765.
- World Health Organization. (2014). *GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases 2014 - Attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility*. Geneva
- World Heart Federation. (2016). Cardiovascular disease risk factors. Consult. 14 november 2016, disponível em <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/>
- Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., & Hori, M. (1999). Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med*, 189(11), 1699-1706.
- Yaoita, H., & Maruyama, Y. (2008). Intervention for apoptosis in cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*, 13(2), 181-191.
-

-
- Yuan, J. (1995). Molecular control of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 7(2), 211-214.
- Yuan, J. (1996). Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J Cell Biochem*, 60(1), 4-11.
- Yuan, J. (1997). Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2), 247-251.
- Yuan, J., Murrell, G. A. C., Trickett, A., & Wang, M. X. (2003). Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1641(1), 35-41.
- Zhou, S., Starkov, A., Froberg, M. K., Leino, R. L., & Wallace, K. B. (2001). Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res*, 61(2), 771-777.
- Zhu, W., Soonpaa, M. H., Chen, H., Shen, W., Payne, R. M., Liechty, E. A., Caldwell, R. L., Shou, W., & Field, L. J. (2009). Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation*, 119(1), 99-106.
